

CONICET



UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE  
SAN MARTÍN

---

I I B I O

## **El rol regulador de la luz en la emisión de compuestos volátiles y las defensas indirectas de las plantas**

Tesina para optar por el título de Licenciada en Biotecnología

Autora: Stephanie Thompson

Directora: Dra. Milena Manzur

Universidad Nacional de San Martín

Laboratorio Biología de Plantas del Dr. Carlos L. Ballaré

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas Rodolfo Ugalde (IIBIO-UNSAM)

- 21 de diciembre del 2021 -

## **Agradecimientos**

A la UNSAM por haberme brindado una formación increíble y a todos los docentes de la carrera que aman lo que hacen y nos transmitieron todo el amor que tienen por la educación.

Al IIBIO-UNSAM, a la cátedra de Biomoléculas y a las fuentes de financiación ANPCyT.

Al Laboratorio de Biología de plantas y al Dr. Carlos L. Ballaré, por darme un lugar para que pudiera realizar el presente trabajo.

A Mile por haberme acompañado en todo este proceso y por enseñarme absolutamente todo. Gracias por haber confiado en mí, por la dedicación y por el aguante.

A Rosario por el apoyo incondicional y por ser la mejor compañera de qPCR que podría tener.

A Cande por haber compartido tan lindos momentos y toda su ayuda en el laboratorio, especialmente para la recolección de tricomas.

A Belu, Belson, Mica, Lu, Cami y Juli por haberme bancado en toda la carrera, sin ustedes no podría haber llegado hasta acá. Son lo más, gracias por todas las risas que compartimos, todas las horas de estudio y por haber hecho divertido estudiar esta carrera.

A mi familia por siempre darme su apoyo. A Nicole y a Juan por bancarme todos estos años. A mi mamá y a mi papá por escucharme, aconsejarme e incentivarme siempre a seguir adelante. A Nany y a Abush que fueron mis mayores seguidores de la carrera y festejaron todos los exámenes aprobados conmigo. Gracias.

# Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>3</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>4</b>
1. Fitocromo B (phyB) .....	4
2. Defensas de las plantas.....	5
3. Fitocromo B y las defensas de las plantas.....	7
4. Domesticación del tomate comercial ( <i>Solanum lycopersicum</i> L).....	8
5. Tricomas.....	9
6. Terpenos.....	12
<b>Hipótesis .....</b>	<b>16</b>
<b>Objetivo general.....</b>	<b>16</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>17</b>
1. Condiciones de crecimiento .....	17
2. Tratamientos.....	17
3. Diseño experimental y análisis estadístico.....	18
4. Respuesta al escape al sombreado.....	18
5. Densidad de tricomas .....	19
6. Acumulación de terpenos en tricomas glandulares tipo VI.....	19
7. Emisión de VOCs.....	20
8. Cromatografía de gases (GC-MS).....	20
9. Extracción de RNA .....	21
10. Evaluación de la calidad y cuantificación del RNA.....	21
11. Tratamiento con DNAsa.....	22
12. Retrotranscripción (RT-PCR) .....	22
13. Diseño de <i>primers</i> .....	22
14. PCR en tiempo real ( <i>Real time</i> PCR, q-PCR).....	22
15. Actina como gen de referencia.....	23
<b>Resultados .....</b>	<b>25</b>
1. Respuesta al escape al sombreado.....	25
2. Densidad de tricomas .....	26
3. Cantidad total de terpenos .....	28
4. Acumulación de terpenos en tricomas glandulares tipo VI.....	29
5. Emisión de VOCs.....	33

6.	Evaluación de la calidad y cuantificación del RNA.....	36
7.	Visualización del cDNA.....	38
8.	Expresión génica .....	39
a.	Expresión relativa de CPT1.....	39
b.	Zingibereno sintasa (Zis).....	40
c.	Valenceno sintasa (TPS17) .....	41
	<b>Discusión.....</b>	<b>43</b>
1.	Respuesta de escape al sombreado .....	43
2.	Densidad de tricomas .....	43
3.	Cantidad total de terpenos .....	45
4.	Terpenos acumulados en tricomas y emitidos (VOCs).....	46
5.	Expresión génica .....	49
	<b>Conclusiones.....</b>	<b>52</b>
	<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>53</b>
	<b>Anexo I: Acumulación de terpenos en tricomas glandulares tipo VI en cada tratamiento.....</b>	<b>60</b>
a.	Tratamiento Amb-C .....	60
b.	Tratamiento Amb-MeJA .....	60
c.	Tratamiento RL-C .....	61
d.	Tratamiento RL-MeJA .....	62
	<b>Anexo II: Emisión de VOCs en cada tratamiento .....</b>	<b>64</b>
a.	Tratamiento Amb-C .....	64
b.	Tratamiento Amb-MeJA .....	65
c.	Tratamiento RL-C .....	66
d.	Tratamiento RL-MeJA .....	67

## Resumen

Las señales lumínicas percibidas por fotorreceptores específicos son una importante fuente de información acerca de la proximidad de las plantas vecinas y el riesgo de competencia. El fitocromo B (phyB) monitorea continuamente los cambios en la relación de Rojo/Rojo Lejano (R:RL), que decrece con el aumento en la densidad del canopeo, dado que la luz R es fuertemente absorbida por la clorofila, mientras que la luz RL es reflejada o transmitida. En condiciones de competencia por luz, que conducen a la inactivación del phyB, se promueve el crecimiento de plantas intolerantes a la sombra (Síndrome de Escape a la Sombra, SAS) y se deprimen las defensas directas de las plantas contra herbívoros y patógenos. En respuesta al ataque de herbívoros, diversas hormonas coordinan e inducen las defensas de las plantas, entre ellas el ácido jasmónico (JA). Las defensas directas son las que se dirigen al organismo atacante, mientras que las defensas indirectas se basan en la atracción de los enemigos naturales del herbívoro. Las defensas indirectas son altamente efectivas contra insectos herbívoros y existen numerosos compuestos orgánicos volátiles (VOCs) del metabolismo secundario que intervienen, principalmente terpenos. Se ha documentado que las emisiones de algunos terpenos parecen ser promovidas en condiciones de inactivación del phyB e inducción con MeJA en plantas de tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*), aunque no se ha registrado aún lo que puede ocurrir con sus parientes silvestres. Las comparaciones entre especies de cultivos domesticados (*S. lycopersicum*) y sus parientes silvestres (e.g. *S. habrochaites*) han revelado que muchos de los metabolitos especializados se han perdido durante la domesticación, entre ellos algunos terpenos. La pérdida de estos importantes compuestos ha llevado a una mayor susceptibilidad de los cultivos domesticados al ataque de patógenos y herbívoros en comparación con sus contrapartes silvestres y la reintroducción de dichos compuestos en las especies de cultivos podría resultar una forma eficaz de combatir la pérdida de cultivos debido a insectos y enfermedades. En esta tesis nos propusimos investigar el cambio en la composición y emisión de VOCs (terpenos) y la variación en los niveles de expresión génica de algunas enzimas involucradas en la síntesis de terpenos (CPT1, Zis, TPS17) en plantas de *S. habrochaites* (LA2167), con las defensas inducidas y en condiciones de competencia por luz (baja relación R:RL). La baja relación R:RL resultó en cambios morfológicos (respuesta típica de SAS), independientemente de la activación de las defensas de las plantas. Los resultados obtenidos permiten demostrar, al menos parcialmente, que el efecto del cambio en la calidad de la luz (baja relación R:RL) y la inducción del sistema de defensas (aplicación externa de MeJA) producen una alteración en las defensas de las plantas, generando un cambio en el *blend* de los compuestos volátiles emitidos por éstas. Asimismo, la combinación de los factores (RL-MeJA) favorece la emisión de

determinados terpenos que participarían en la atracción de insectos predadores de los herbívoros frecuentes de las plantas de *S. habrochaites*. La inactivación del fitocromo B no tuvo un efecto significativo a nivel transcripcional sobre las enzimas CPT1 y TPS17. Respecto a la Zis es necesario diseñar otros primers para poder analizarla. Es importante avanzar en entender los mecanismos mediante los cuales el RL estaría afectando la composición y emisión de terpenos. Asimismo, se deberían diseñar bioensayos con diferentes composiciones de terpenos para entender las interacciones tritróficas que tienen las especies silvestres del género *Solanum*.

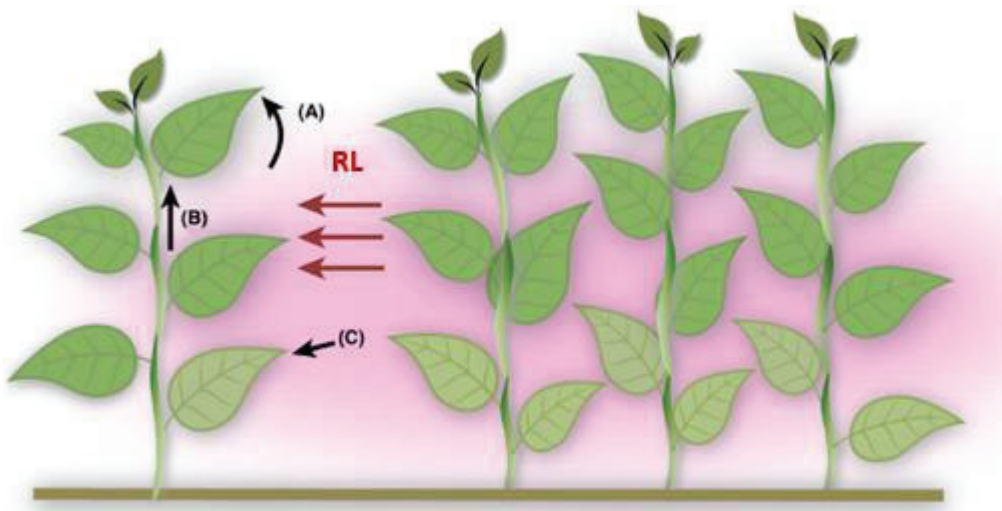
## Abreviaturas

ACT	Actina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
Amb	Ambiente
Amb-C	Tratamiento con luz ambiente control sin aplicación de MeJA
Amb-MeJA	Tratamiento con luz ambiente con aplicación de MeJA
ARN	Ácido ribonucleico
BrET	Bromuro de Etidio
CPT1	cis-preniltransferasa
DE	Desvío estándar
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
MeJA	Metil jasmonato
PAR	Radiación Fotosintéticamente Activa
phyB	Fitocromo B
q-PCR	PCR en tiempo real
R	Rojo
RL	Rojo lejano
R:RL	Proporción rojo:rojo lejano
RL-C	Tratamiento con una relación baja de R:RL control sin aplicación de MeJA
RL-MeJA	Tratamiento con una relación baja de R:RL con aplicación de MeJA
RT-PCR	PCR de transcripción inversa
TPS	Terpeno sintasa
TPS17	Valenceno sintasa
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles
Zin	Zingibereno sintasa

## Antecedentes

### 1. Fitocromo B (phyB)

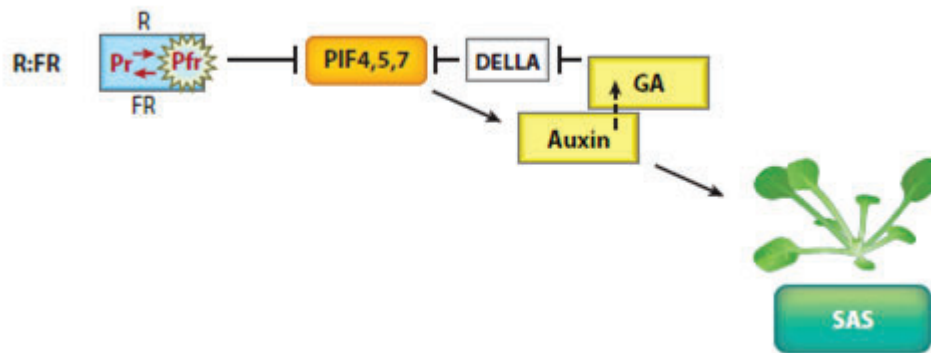
En canopeos vegetales, la luz es fuente de energía para la fotosíntesis y también provee información que las plantas emplean para optimizar su morfología y fisiología. Las señales lumínicas percibidas por fotorreceptores específicos son una importante fuente de información acerca de la proximidad de las plantas vecinas y el riesgo de competencia (Ballaré & Pierik, 2017). El fitocromo B (phyB) monitorea continuamente los cambios en la relación de Rojo/Rojo Lejano (R:RL). La relación R:RL decrece con el aumento en la densidad del canopeo, dado que la luz roja es fuertemente absorbida por la clorofila, mientras que la luz RL es reflejada o transmitida (Ballaré et al., 1990; 1987). Las plantas intolerantes a la sombra responden a las bajas relaciones R:RL promoviendo la elongación de sus tallos y pecíolos y cambiando el ángulo de inserción de sus hojas, maximizando así la interceptación de la luz en canopeos muy densos (Síndrome de Escape al Sombreo o SAS; Fig. 1) (Ballaré & Pierik, 2017; Casal, 2012; Smith, 1995). Los entrenudos de las plantas con tallos verticales pueden detectar y responder de manera autónoma a la radiación RL lateral, incluso si las hojas, los principales órganos captadores de luz, todavía no están expuestas a señales de competencia, lo que le permite a la planta utilizar de manera eficiente esta radiación como una señal temprana de competencia (Ballaré, 2017; Ballaré et al., 1990).



**Figura 1.** Detección de plantas vecinas y respuestas locales de los órganos vegetales a los cambios en las proporciones de rojo:rojo lejano (R: RL). Las respuestas locales a las proporciones bajas de R:RL, como las ilustradas en la figura, permiten que las plantas alteren su arquitectura para optimizar la interceptación de la luz. (A) Respuestas hiponásticas locales; (B) respuestas de elongación de los entrenudos provocadas por la radiación RL percibida por el tallo; y (C) inducción local de senescencia foliar. Adaptado de Ballaré et al. (2017).



En condiciones de alta relación R:RL, el fitocromo B reside en el núcleo, predominantemente en su forma activa (Pfr), evitando la acumulación y la actividad de factores de transcripción promotores del crecimiento conocidos como PIFs (*Phytochrome-interacting factors*) (Jeong & Choi, 2013; Leivar & Quail, 2011). Cuando la relación R:RL se reduce por la proximidad de otras plantas, el phyB se inactiva parcialmente, ya que los niveles de Pfr se reducen por la fotoconversión promovida por el RL a la forma inactiva del fotorreceptor (Pr). Cuando esto sucede, hay un aumento en la actividad de los PIFs, lo que promueve la síntesis de enzimas involucradas en la síntesis de auxinas. Los niveles elevados de auxinas conducen a un alargamiento más rápido del tallo y del pecíolo. Las proporciones bajas de R:RL también pueden producir niveles elevados de giberelinas (GA). Las GA desencadenan la degradación de las proteínas DELLA, que son represoras de los PIFs, desencadenando en la conocida respuesta SAS (Fig. 2; Ballaré, 2014).



**Figura 2.** Mecanismos detrás de la activación del síndrome del escape al sombreado (SAS). Adaptado de Ballaré (2014).

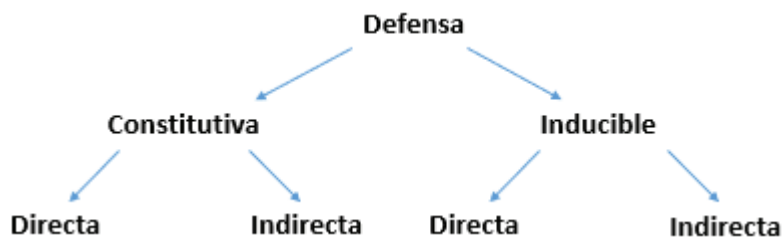
En canopeos densos, con altos niveles de competencia por la luz, las plantas intolerantes al sombreado típicamente deprimen sus defensas contra herbívoros y patógenos (Ballaré, 2014), presumiblemente para ahorrar recursos que podrían usarse para activar respuestas de crecimiento (Cipollini, 2004).

## 2. Defensas de las plantas

A lo largo de todo su ciclo de vida, las plantas superiores son desafiadas por diferentes tipos de estreses, tanto abióticos como bióticos. El estrés biótico está representado, en particular, por organismos heterótrofos, los cuales dependen de la energía fijada por las plantas autótrofas. Por lo tanto, los organismos heterótrofos intentan utilizar las plantas como fuente de alimento. Como organismos sésiles, las plantas no tienen ninguna posibilidad de escapar de los ataques de los organismos, por lo que deben emplear otras estrategias para defenderse (Mithöfer & Boland, 2012). Existen numerosas estrategias de

defensas que se basan en la capacidad de sintetizar distintos compuestos denominados metabolitos especializados, que representan una barrera importante para la herbivoría (Mithöfer & Boland, 2012).

Las plantas poseen una reserva de compuestos potencialmente defensivos, se trata de metabolitos secundarios que no participan en los procesos básicos de crecimiento celular, de forma que su ausencia no provoca la muerte directa de la planta sino una amenaza para la defensa del organismo (Kumar et al., 2014). En principio, se pueden distinguir dos categorías de defensas vegetales, las defensas constitutivas que están siempre presentes y las defensas inducibles, que pueden ser activadas en respuesta a un ataque. Se puede hacer una distinción adicional entre defensas tanto constitutivas como inducibles, cada una puede ser directa o indirecta (Fig. 3). Las defensas directas se dirigen al organismo atacante, por ejemplo, el desarrollo de tricomas, espinas y metabolitos secundarios tóxicos que afectan negativamente la fisiología y el comportamiento del herbívoro (Dicke & Baldwin, 2010; Dudareva et al., 2006). Las defensas indirectas actúan a través de la atracción de organismos de un nivel trófico adicional, como por ejemplo parasitoides o depredadores del herbívoro (Heil, 2008).



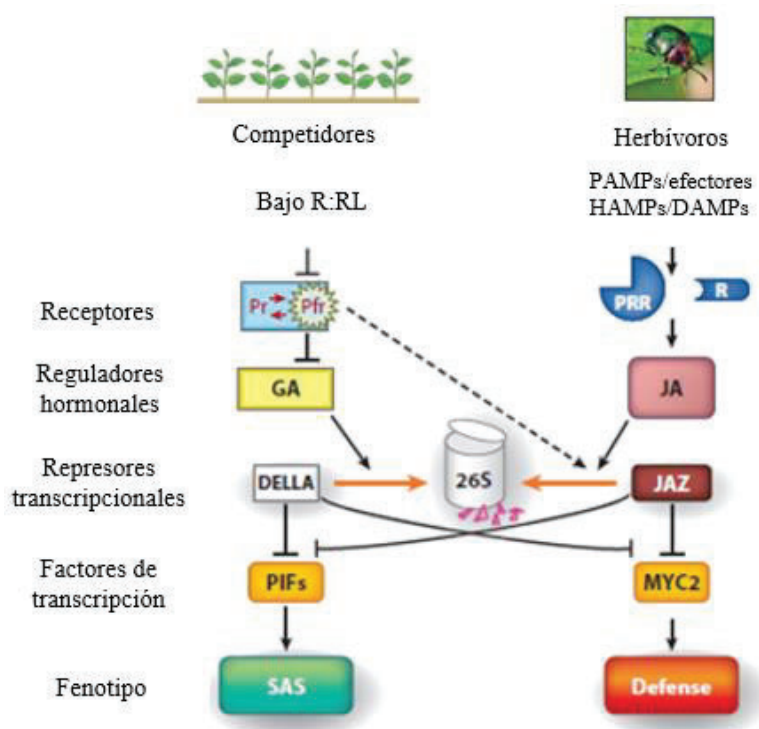
**Figura 3.** Tipos de defensas en plantas.

Las plantas pueden producir una gran diversidad de compuestos orgánicos volátiles (VOCs). La emisión de estos metabolitos secundarios puede incrementarse fuertemente como resultado de ciertos estreses bióticos o abióticos (Dicke & Baldwin, 2010; Dong et al., 2016; Schoonhoven et al., 2005). Frente al ataque de herbívoros se emiten varios VOCs como mecanismo de defensa natural (Dicke & Baldwin, 2010; Rodríguez-Saona & Frost, 2010; War et al., 2012). Los VOCs también juegan un papel importante en la comunicación entre plantas y animales (Dicke & Baldwin, 2010). Existe evidencia que demuestra que el ataque de herbívoros induce la emisión de VOCs con efecto repelente a patógenos o con efecto atractivo para los enemigos naturales de los herbívoros (D'Alessandro & Turlings, 2005; Erb et al., 2009; Turlings et al., 1990). Los VOCs generalmente forman mezclas complejas que dependen del genotipo de la planta (Halitschke et al., 2000; Loughrin et al., 1995). Son compuestos líquidos lipofílicos con bajo peso molecular y alta presión de vapor a temperatura ambiente. Las propiedades físicas de estos compuestos les permiten atravesar las membranas celulares y liberarse al

ambiente (Pichersky et al., 2006). Según su origen biosintético, los VOCs se dividen en varias clases, que incluyen a los fenilpropanoides, los derivados de ácidos grasos y aminoácidos y los terpenoides (Dudareva et al., 2013).

### 3. Fitocromo B y las defensas de las plantas

Se ha documentado que, cuando las plantas intolerantes a la sombra se exponen simultáneamente a la competencia por luz y a señales que simulan el ataque por herbívoros, las respuestas a la baja relación R:RL tienen prioridad sobre las respuestas de defensa (Ballaré, 2014). En *Arabidopsis thaliana*, existe evidencia que demuestra que cuando las plantas se tratan a la vez con metil-JA (MeJA) y radiación RL suplementaria, las proporciones bajas de R:RL reprimen la expresión de los marcadores de respuesta de JA, pero el MeJA no logra reducir la expresión de los marcadores de respuesta de SAS y eliminar las respuestas de elongación del pecíolo a un R:RL bajo (de Wit et al., 2013). En conjunto, estos resultados sugieren que cuando las plantas de *A. thaliana* intolerantes a la sombra se exponen simultáneamente a señales de competencia por plantas vecinas y a señales de herbivoría, las respuestas a R:RL bajo tienen prioridad sobre las respuestas a JA. En la figura 4 se pueden observar los efectos que tiene la baja relación R:RL en la vía de señalización del JA. Como se mencionó anteriormente, las proporciones bajas de R:RL producen niveles elevados de giberelinas (GA), que desencadenan la degradación de las proteínas DELLA. Las proteínas DELLA son reguladoras positivas de la señalización del JA, ya que se unen a JAZ e impiden que repriman los factores de transcripción que responden al JA (Hou et al., 2010). Las proteínas JAZ bloquean las respuestas JA al reprimir la actividad de factores de transcripción críticos que regulan la resistencia a los insectos, la iniciación de tricomas y la resistencia a patógenos necrotróficos (Fernández-Calvo et al., 2011; Leone et al., 2014; Qi et al., 2011; Zhu et al., 2011). Por lo tanto, la degradación de las proteínas JAZ desencadena la activación de las defensas inducidas por JA (Leone et al., 2014). La activación de la vía del JA asociada con la herbivoría desencadena la biosíntesis de JA, que conduce a la defensa al aumentar la degradación de los represores JAZ. Por lo tanto, el aumento de los niveles de GA conduce a una degradación de las DELLA y a una represión más fuerte de la respuesta de JA por parte de las JAZ. Es por eso que las bajas proporciones de R:RL parecen cambiar el equilibrio de las respuestas de defensa a SAS al causar una mayor degradación de DELLA y al aumentar la estabilidad de JAZ (Ballaré, 2014).



**Figura 4.** Efectos de la baja relación R:RL sobre la sensibilidad al jasmonato (JA). Adaptado de Ballaré (2014).

Trabajos más recientes del grupo en *A. thaliana* demuestran que la baja relación R:RL reduce la concentración de JA dentro del tejido y promueve la acumulación de jasmonato inactivo ( $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-JA}$ ). *In vitro*, este metabolito es sintetizado por la sulfotransferasa ST2a, y se encontró que el gen ST2a está regulado positivamente por los tratamientos con RL que simulan competencia (Fernández-Milmanda et al., 2020). Sin embargo, en el caso de las plantas del género *Solanum*, los mecanismos moleculares que explican los efectos de la baja relación R:RL sobre la sensibilidad a JA aún no están del todo claros.

#### 4. Domesticación del tomate comercial (*Solanum lycopersicum* L)

La domesticación se caracteriza por la fuerte selección artificial de una amplia gama de rasgos morfológicos y fisiológicos que da como resultado fenotipos que difieren considerablemente del ancestro salvaje (Doebley et al., 2006). Una hipótesis frecuente que explica la alta susceptibilidad de muchos cultivos a plagas y enfermedades es que, en el proceso de domesticación, los cultivos han perdido genes y rasgos defensivos contra plagas y enfermedades (Khush, 2001; Whitehead et al., 2017).

El tomate (*S. lycopersicum*) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial (Quinet et al., 2019). Existen numerosas especies y variedades de tomate distintas que crecen en distintas regiones geográficas y difieren en la resistencia a las enfermedades, uno de los parientes silvestres del tomate comercial es *Solanum habrochaites* S.Knapp &

D.M. Spooner (Van Eck et al., 2006). Análisis moleculares mostraron que el proceso de domesticación dio como resultado niveles relativamente bajos de variación genética (Bai & Lindhout, 2007). En consecuencia, el tomate cultivado actual (*S. lycopersicum*) ha perdido importantes rasgos de resistencia y defensas indirectas (Li et al., 2018). Existe evidencia que indica que los cultivares silvestres de tomate mostraron más tolerancia a las plagas y enfermedades que las variedades cultivadas (Ferrero et al., 2020). Se encuentra reportado que los enemigos naturales de los herbívoros de la especie tienen una atracción reducida a los tomates domesticados, lo que sugiere que la producción de los volátiles del tomate domesticado ha divergido de la de sus parientes silvestres (Li et al., 2018). En dicho estudio se sugiere que los enemigos naturales se orientan hacia los VOCs inducidos por herbívoros producidos por los parientes silvestres más rápidamente que hacia el tomate domesticado, por lo que los parientes silvestres producirían una mezcla de VOCs más atractiva (Li et al., 2018). Los VOCs son liberados por las plantas de estructuras denominadas tricomas, que son capaces de producir y almacenar grandes cantidades de volátiles (Tissier et al., 2017).

La importancia económica del tomate, junto a la disponibilidad de parientes silvestres que sintetizan diversos metabolitos derivados de tricomas glandulares ha generado interés en utilizar el germoplasma para mejorar la resistencia a los insectos (Alba et al., 2009; Antonious et al., 2005; Antonious & Snyder, 2006; Hartman & Clair, 2008; Lawson et al., 1997; Lucatti, 2010; Wilson Roberto Maluf et al., 2010). *S. habrochaites* es una especie de tomate silvestre nativa del sur de Ecuador y Perú que se caracteriza por una abundancia de tricomas glandulares que sintetizan diversos metabolitos especializados repelentes de insectos, incluidos los terpenos (Besser et al., 2009; Bleeker et al., 2009; Sallaud et al., 2009; Sifres et al., 2011).

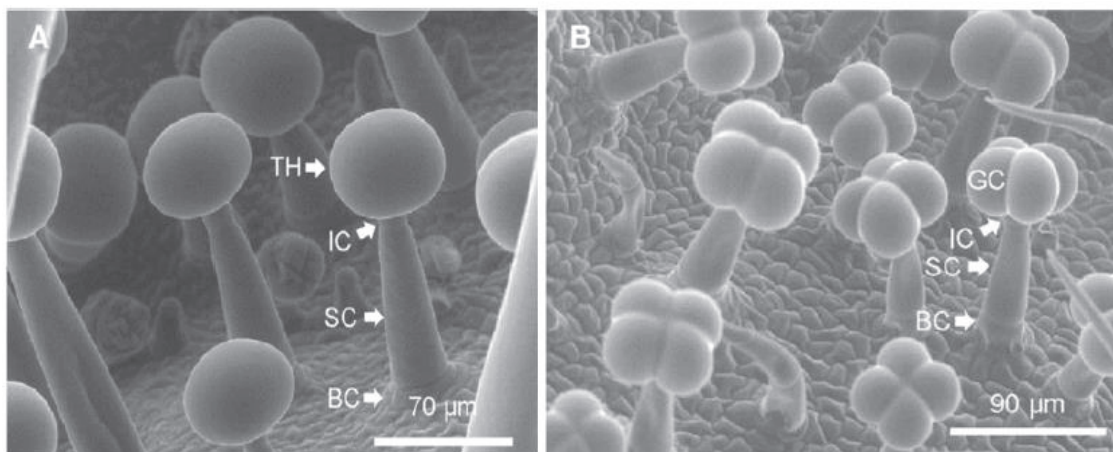
## 5. Tricomas

Los tricomas glandulares son apéndices epidérmicos que se encuentran en la superficie de muchas especies de plantas, que sirven como primera línea de defensa contra insectos y patógenos a través de la síntesis y almacenamiento de metabolitos especializados (Nagel et al., 2008; Olsson et al., 2009; Sirikantaramas et al., 2005; G. Turner et al., 1999; G. Wang et al., 2008; Xie et al., 2008). Los tricomas también tienen otras funciones, incluida la atracción de polinizadores, la protección contra los rayos UV debido a la presencia de flavonoides y otros elementos que absorben los rayos UV, regulación de la temperatura y reducción de la pérdida de agua (Ehleringer, 1984; Johnson, 1975; G Karabourniotis et al., 1998; George Karabourniotis et al., 1995; Werker, 2000).

Los tricomas se componen de estructuras unicelulares o multicelulares, y se dividen en dos categorías generales: pueden ser no glandulares o glandulares. Los tricomas no

glandulares no participan en la producción, almacenamiento y/o liberación de compuestos químicos (Werker, 2000). Se conocen por su acción exclusivamente sobre la protección física de las plantas frente a estreses bióticos y abióticos, formando una barrera protectora frente a la baja humedad, las altas temperaturas y la radiación solar y por interferir con la herbivoría al inhibir el contacto con la epidermis de las hojas (Baur et al., 1991; Levin, 1973; Werker, 2000). Los tricomas glandulares son capaces de producir y almacenar grandes cantidades de volátiles. Tal acumulación de VOCs permite a las plantas responder rápidamente al ataque de herbívoros sin la regulación de las vías biosintéticas de los metabolitos (F. Wang et al., 2020).

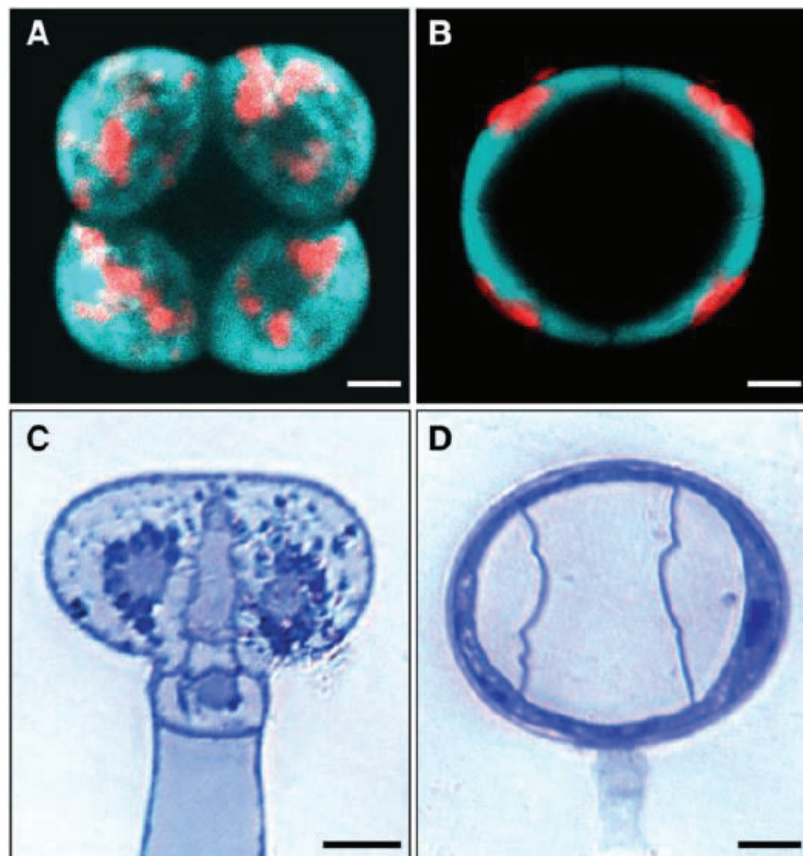
Los tricomas glandulares de las *Solanáceas* son estructuralmente diversos y sintetizan distintas clases de compuestos (Gonzales-Vigil et al., 2012). Estos compuestos están implicados en las defensas de las plantas actuando directamente como toxinas o repelentes o indirectamente a través de interacciones tritróficas (Alba et al., 2009; Bleeker et al., 2009, 2011; Dicke & Baldwin, 2010). Existen distintos tipos de tricomas, pero los tricomas glandulares tipo VI representan el tipo de tricoma más abundante en varias especies de tomate, y sintetizan y almacenan los terpenos que son luego emitidos por las plantas en forma de volátiles. Dichos tricomas tienen una arquitectura específica con cuatro células glandulares dispuestas en un plano encima de una célula intermedia y una única célula de tallo (Fig. 5) (Bergau et al., 2015). Las células glandulares de los tricomas de *S. habrochaites* no se pueden distinguir desde el exterior (Fig. 5A).



**Figura 5.** Microscopía electrónica de barrido de tricomas de tipo VI en *S. habrochaites* LA1777 (A) y *S. lycopersicum* LA 4024 (B). Se indica la célula basal (BC), la célula del tallo (SC), la célula intermedia (IC), la cabeza del tricoma (TH) y la célula glandular (GC). Adaptado de Bergau et al. (2015).

Existen numerosos reportes que documentan que los tricomas glandulares de las especies silvestres de tomate tienen mayor productividad metabólica que las plantas de tomate cultivado. Hay dos factores que contribuyen a que esto sea así, por un lado *S. habrochaites*

tiene una mayor densidad de tricomas glandulares tipo VI y por otro, tienen una mayor actividad metabólica por tricoma (Bergau et al., 2015). Los tricomas tipo VI de *S. habrochaites* tienen un gran espacio intracelular donde se pueden acumular los metabolitos, por el contrario, los tricomas tipo VI del tomate cultivado tiene una cavidad muy pequeña, lo que deja poco espacio de almacenamiento de metabolitos (Fig. 6) (Bergau et al., 2015). El tamaño de la cavidad de los tricomas de *S. habrochaites* permite que se produzcan y se almacenen 90 veces más terpenos que en los tricomas de *S. lycopersicum* (Balcke et al., 2017). Para acumularse dentro de las cavidades de los tricomas, los VOCs tienen que moverse direccionalmente desde el sitio de su biosíntesis a través de la membrana plasmática y la pared celular. Todas las moléculas involucradas en la salida de los VOCs de las células glandulares siguen siendo en gran parte desconocidas. También existen mecanismos que permiten una retención de altos niveles de VOCs dentro de la cavidad, los cuales se desconocen (Tissier et al., 2017).



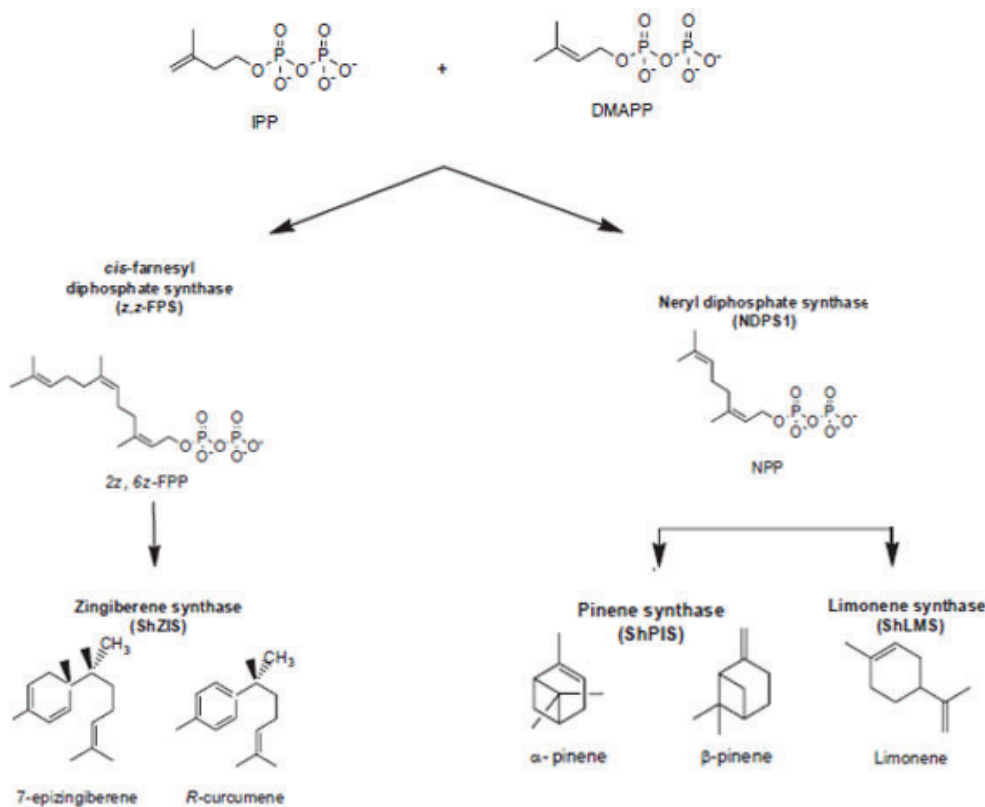
**Figura 6.** Microscopía de fluorescencia y campo brillante de cabezas de tricomas tipo VI. Imágenes de microscopía de fluorescencia de cabezas de tricomas de *S. lycopersicum* LA4024 (A) y *S. habrochaites* LA1777 (B). Imágenes de microscopía de campo brillante de secciones de tricomas de tipo VI adheridos a las hojas y teñidos con azul de toluidina de *S. lycopersicum* LA4024 (C) y *S. habrochaites* LA1777 (D). Las barras horizontales corresponden a 10  $\mu$ m en todos los paneles. Adaptado de Bergau et al. (2015).

Existe evidencia de que la aplicación de metil jasmonato (MeJA) a plantas para simular herbivoría, lleva a un aumento en la densidad de tricomas glandulares en hojas jóvenes (Boughton et al., 2005), sin embargo, la densidad de los tricomas podría modificarse ante el efecto combinado de JA y los cambios en la calidad de la luz.

## 6. Terpenos

En la naturaleza, las plantas están integradas en un complejo sistema de interacciones bióticas y, debido a que son organismos sésiles, han desarrollado estrategias específicas para defenderse de organismos atacantes. En este contexto, las plantas producen una amplia variedad de metabolitos secundarios que incluyen a los terpenoides que contribuyen directamente a la defensa contra los herbívoros actuando como repelentes y/o tóxicos, e indirectamente atrayendo enemigos naturales (Dudareva et al., 2013; Unsicker et al., 2009). Los terpenoides son una clase grande y diversa de metabolitos vegetales que incluyen a los monoterpenos (C10) y a los sesquiterpenos (C15). Estos compuestos desempeñan un papel importante en la defensa directa e indirecta contra patógenos y herbívoros o como atrayentes para polinizadores (Yang et al., 2021). Todos los terpenoides se originan a partir de los componentes básicos del difosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) (Fig. 7) (Dudareva et al., 2013). El difosfato de nerilo (NPP) sirve como precursor para la formación de monoterpenos, mientras que el *cis,cis*-pirofosfato de farnesilo (*Z,Z*-FPP) se utiliza para la formación de los sesquiterpenos en *S. habrochaites* (Gonzales-Vigil et al., 2012; Zabel et al., 2020). La diversidad de terpenos emitidos por las plantas se debe a la presencia de las terpeno sintasas (TPSs), que son las enzimas que sintetizan estos compuestos, muchas de las cuales tienen la capacidad de sintetizar múltiples productos a partir de un solo sustrato (Degenhardt et al., 2009).



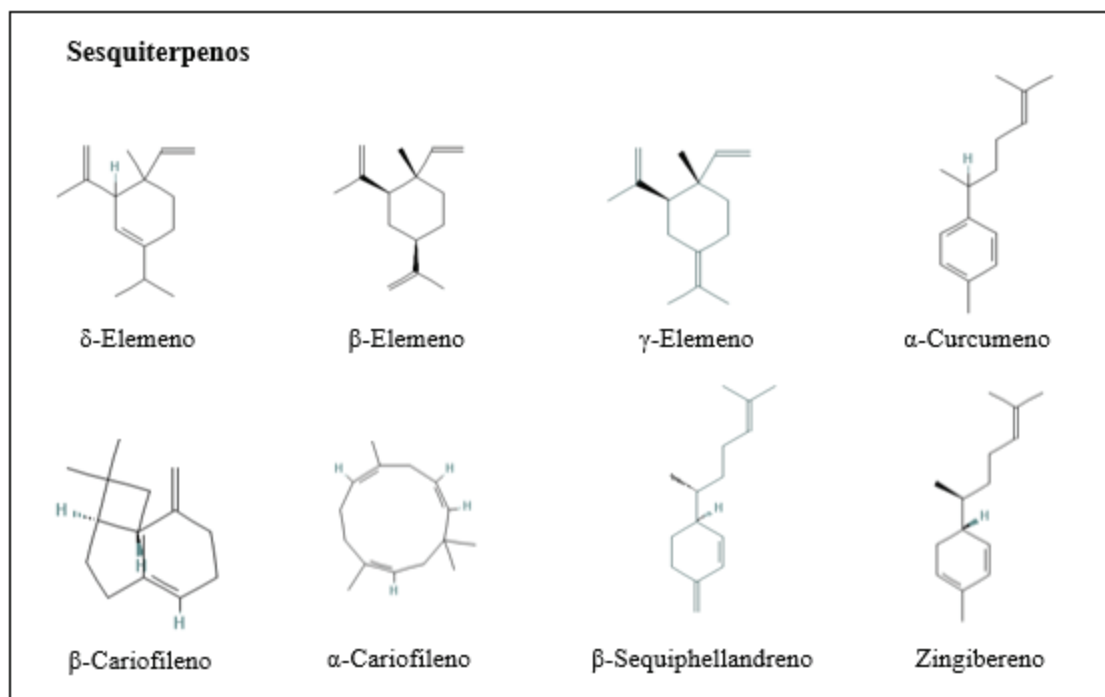


**Figura 7.** Biosíntesis de terpenos en tricomas de *S. habrochaites* utilizando los sustratos NPP y 2z, 6z-FPP. Adaptado de Gonzales-Vigil et al. (2012).

Durante la domesticación de cultivos, los metabolitos implicados en la resistencia a las plagas a menudo se perdían debido a la falta de selección de estos rasgos tras la selección para mejorar el rendimiento (Yactayo-chang et al., 2020). Los principales terpenos en *S. lycopersicum* son los monoterpenos, mientras que *S. habrochaites* emite en su gran mayoría sesquiterpenos (Schillmiller et al., 2009; Zabel et al., 2020). Los compuestos pequeños altamente volátiles, como los monoterpenos, difunden rápidamente en el espacio y se diluyen en la atmósfera. Para tales compuestos, la función de señalización probablemente se limite a la misma planta, como una señal sistémica dentro de la planta, y a plantas vecinas cercanas (Baldwin et al., 2006). Los compuestos más pesados con menos volatilidad, como los sesquiterpenos, tienen más probabilidades de funcionar como señales en distancias más largas. La dispersión permite el desarrollo de columnas de concentraciones más altas que pueden ser transportadas más lejos como paquetes intactos por el aire (Baldwin et al., 2006).

Las distintas accesiones de *S. habrochaites* muestran una alta variabilidad en su composición de terpenos, los perfiles de terpenos están altamente correlacionados con la distribución geográfica de las accesiones (Gonzales-Vigil et al., 2012). Las plantas de *S. habrochaites* LA2167 emiten una amplia variedad de terpenos, uno de los compuestos mayormente emitidos es el zingibereno (Fig. 8) (Yactayo-chang et al., 2020). El

*zingibereno* parece conferir una gama amplia de resistencia contra diversas plagas, incluidas la polilla del tomate (*Tuta absoluta*), la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), la araña roja (*Tetranychus evansi*) y el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) (Carter et al., 1989; de Azevedo et al., 2003; Freitas et al., 2002; Wilson R Maluf et al., 2001; Wilson Roberto Maluf et al., 2010). Bioensayos de actividades antibacterianas, fungicidas e insecticidas mostraron que el *zingibereno* exhibe una variedad de actividades biológicas, lo que respalda su papel en la defensa de las plantas de tomate contra diversas plagas (Zabel et al., 2020).



**Figura 8.** Terpenos reportados almacenados en los tricomas de las plantas de *S. habrochaites* (LA2167). Adaptado de Gonzales-Vigil et al. (2012).

Como la mayoría de los VOCs están regulados por JA, las emisiones de varios de estos compuestos se ven reducidas por la baja relación R:RL (Kegge et al., 2013). Sin embargo, las emisiones de algunos terpenoides parecen ser promovidas en condiciones de inactivación del fitocromo B (Cortés et al., 2016; Kegge et al., 2013, 2015). Si bien se sabe que las emisiones de VOCs son frecuentemente reguladas por JA (Degenhardt et al., 2010), no se conoce aún el mecanismo por el cual la inactivación del fitocromo B modificaría la síntesis y la liberación de dichos compuestos (Ballaré, 2014). Uno de los posibles efectos de la inactivación del fitocromo B podría ser sobre los niveles de expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de los terpenos y/o sobre los mecanismos de liberación de los mismos desde los tricomas.

Los VOCs pueden servir como señales externas en la comunicación dentro de la planta, proporcionando una ventaja para el emisor, pero también como señales que pueden

inducir respuestas en plantas cercanas (Heil & Silva Bueno, 2007). Desde la perspectiva del receptor, los VOCs representan las señales más rápidas y confiables en la detección de plantas vecinas, ya que están presentes constantemente en comparación con las señales periódicas como la luz, el contacto mecánico o las señales acústicas (Dicke & Loreto, 2010). La emisión de VOCs altamente específicos permite la identificación y respuesta a señales de la misma especie o incluso parientes (Karban et al., 2014). De esa manera, las plantas cercanas pueden utilizar las señales volátiles para detectar la presencia de plantas vecinas específicas e inducir respuestas de crecimiento que aumentan su competitividad (Baldwin et al., 2006; Dicke et al., 2003; Heil & Karban, 2010).

## **Hipótesis**

En condiciones de competencia por luz y estrés por herbivoría, se produce una alteración en la composición de terpenos volátiles emitidos por las plantas de *Solanum habrochaites*, por lo que aumenta la proporción de compuestos volátiles que participan en la atracción de insectos predadores/parasitoides de los herbívoros frecuentes para esta especie.

## **Objetivo general**

Investigar el cambio en la composición y emisión de VOCs y la variación en los niveles de expresión génica en plantas de *S. habrochaites* (cv. LA2167) con las defensas inducidas (simulando el ataque de insectos herbívoros) y en condiciones de baja relación R:RL (simulando competencia por luz).

## **Objetivos específicos**

- 1) Evaluar el efecto que tiene la baja relación R:RL y la inducción de las respuestas de defensa mediadas por JA sobre el crecimiento de la planta y el cambio en el ángulo de inserción foliar (SAS) y sobre la densidad de tricomas glandulares tipo VI presentes en las hojas.
- 2) Evaluar el efecto de la baja relación R:RL y la inducción de las respuestas de defensa mediadas por JA sobre la acumulación y composición de terpenos en tricomas glandulares tipo VI y en la emisión de VOCs en plantas de *S. habrochaites*.
- 3) Evaluar el efecto de la baja relación R:RL y la inducción de las respuestas de defensa mediadas por JA sobre los niveles de expresión génica de terpenos sintetasas en hojas de *S. habrochaites*.

## Metodología

### 1. Condiciones de crecimiento

Para realizar los experimentos se trabajó con plantas de 20-25 días de edad (4-5 hojas verdaderas completamente diferenciadas). El material vegetal fue obtenido a partir de clones de plantas adultas de *S. habrochaites* (accesión LA2167, provisto por TGRC, UC-Davis, USA), crecidas en una cámara crecimiento bajo condiciones controladas de luz (radiación PAR  $298 \pm 15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y temperatura (19/24 °C) en un régimen de fotoperiodo largo (ciclos de 16/8 horas de luz/oscuridad, respectivamente).

### 2. Tratamientos

Se aplicaron dos tratamientos de luz: 1) Luz blanca (radiación PAR 400-700 nm, tecnología LED) y 2) Para simular competencia por luz (canopeos densos) se enriqueció la luz blanca con rojo lejano (RL, 730 nm, tecnología LED). Este tratamiento consiste en dar un pulso de luz RL durante 2 horas al final del día (*end of day*) y luego al día siguiente volver a prenderlo durante todo el día (16 horas; Fig. 9). Para simular el ataque de herbívoros e inducir el sistema de defensas de las plantas, éstas fueron tratadas con una solución de metil jasmonato (MeJA, Sigma-Aldrich). Las plantas fueron rociadas con la solución de MeJA (450  $\mu\text{M}$ ) con etanol absoluto (Merck) y agua, 24 horas previo a la medición (Fig. 1).



**Figura 9.** Esquema temporal de la aplicación del tratamiento con luz enriquecida con rojo lejano (RL) y la aplicación del tratamiento con MeJA (450  $\mu\text{M}$ ). Se indica también el momento de las mediciones.

Para simular condiciones de competencia por luz se suplementó el ambiente lumínico con radiación lateral de Rojo Lejano (730 nm). Para esto se colocó un filtro vertical de sombra selectivo a 4 cm de las plantas que sólo permite el paso de Rojo Lejano (Fig. 10). El filtro consiste de una lámina acrílica azul de 2,4 mm (Paolini 2031, La Casa del Acetato) cubierta con película de acetato rojo (La Casa del Acetato).



**Figura 10.** Detalle del tratamiento de luz enriquecida con rojo lejano (RL, led 230 nm) suplementada con un filtro de acetato a los que se sometieron a las plantas de *S. habrochaites*.

### 3. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño con dos factores (herbivoría simulada con MeJA y competencia por luz simulada con luz enriquecida con RL) y dos niveles por cada factor (Tabla 1). Se trabajó con 5-10 réplicas biológicas por tratamiento en función de las variables de respuesta que se midieron. Los análisis estadísticos para analizar las concentraciones de los terpenos acumulados en los tricomas y los emitidos (VOCs) se hicieron mediante una ANOVA de dos vías, mientras que para el análisis de la expresión relativa de las terpeno sintasas se realizó un test-t. El análisis estadístico de las proporciones de terpenos acumulados en los tricomas y emitidos (VOCs) en cada tratamiento particular se hicieron mediante un ANOVA de una vía (Ver Anexo I y II, respectivamente). Para ello se utilizó el software estadístico *R studio* (RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>). Se realizó el test de *Shapiro* para evaluar si los datos se ajustan a una distribución normal y el test de *Levene* para evaluar la homogeneidad de las varianzas. Para aquellos datos que no se ajustaron a una distribución normal y/o a varianzas homogéneas se modeló la varianza.

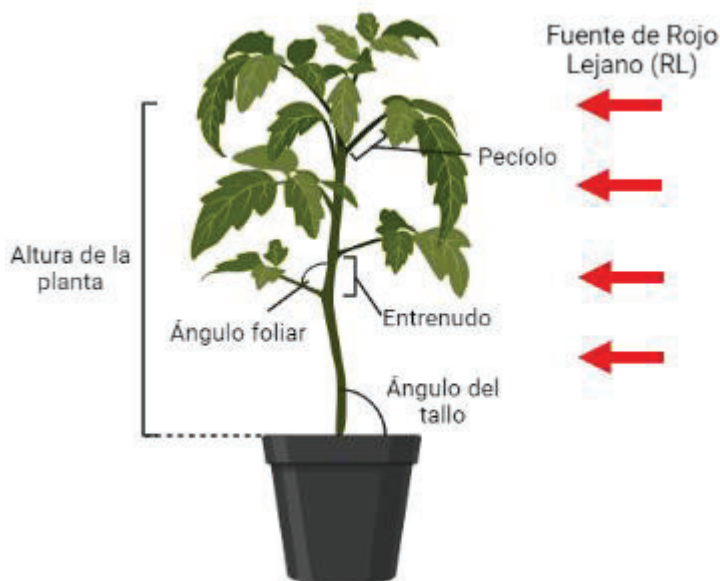
**Tabla 1:** Tratamientos realizados para simular herbivoría y competencia.

	Luz Ambiente (Amb)	Luz Ambiente + RL
MeJA	Herbivoría	Herbivoría y competencia
Control (sin MeJA)	Sin herbivoría ni competencia	Competencia

### 4. Respuesta al escape al sombreado

Para verificar la respuesta de las plantas al tratamiento de luz enriquecida con RL, se evaluaron parámetros morfológicos y patrones de crecimiento asociados a la respuesta de

escape a la sombra. Entre ellos están: la elongación del tallo, la inclinación del tallo (ángulo con respecto al plano horizontal), el largo del peciolo y el ángulo foliar de la penúltima hoja completamente expandida (Fig. 11).



**Figura 11.** Diagrama que muestra los principales parámetros medidos para evaluar y caracterizar la respuesta de escape al sombreado (SAS).

## 5. Densidad de tricomas

Se evaluó el efecto de los tratamientos de luz enriquecida con RL y MeJA sobre la densidad de tricomas glandulares tipo VI presentes en los folíolos. Se realizaron dos mediciones, a las 24 h de la aplicación de MeJA (Fig. 1) y para corroborar si es que había un efecto de MeJA a largo plazo se decidió medir a los 8 días de la aplicación. Se utilizó una lupa binocular (50X, Nikon SMZ800, Japón) para obtener imágenes de las caras adaxial y abaxial de las hojas y mediante el programa *Image Pro Plus 4.5* se determinó la densidad de tricomas glandulares tipo VI (tricomas.cm<sup>-2</sup>).

## 6. Acumulación de terpenos en tricomas glandulares tipo VI

Se utilizó un protocolo de extracción de tricomas y cuantificación de terpenos (Xu et al., 2018). Brevemente, el procedimiento consistió en recolectar bajo la lupa binocular (50X, Nikon SMZ800, Japón) con una pipeta Pasteur de vidrio con la punta estirada aproximadamente unos 500 tricomas glandulares tipo VI por planta. A medida que se fueron recolectando, los mismos se resuspendieron en un tubo *ependorf* con 150  $\mu$ l de ciclohexano mantenido en hielo para evitar su evaporación. Se agregó 0,015 g de sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a cada una de las muestras, se homogeneizaron con un *vortex* y se centrifugaron durante 5 minutos a 12000 rpm a 20 °C. Luego, se tomó el sobrenadante y se lo colocó en los viales que se utilizaron para su posterior análisis mediante

cromatografía de gases asociado a un espectro de masa (GC-MS). Los viales se mantuvieron en frío (-20 °C) con cinta de teflón para su mayor conservación hasta el momento de la medición. Se utilizó una solución de dodecano (C12; Sigma-Aldrich) de concentración conocida (5 ng.  $\mu\text{l}^{-1}$ ) como estándar interno.

## 7. Emisión de VOCs

La colección de volátiles se llevó a cabo siguiendo la metodología adaptada de Braccini et al. (2015). La metodología consiste en envolver la parte aérea de las plantas con una bolsa PET (Polibags, Argentina), a la cual se le suministró aire filtrado a través de carbón activado impulsado por una bomba de aire (12V AIRPO), luego de ventilar la planta el aire fue succionado. El aire saliente pasó a través de una trampa para la colección de volátiles confeccionada con 30 mg HayeSep Q adsorbant (Grace, Deerfield, IL, USA) donde los volátiles fueron adsorbidos para su posterior análisis (Fig. 12). La colecta duró 3 horas, luego las trampas fueron envueltas en cinta de teflón y papel aluminio y almacenadas en el freezer hasta su elución. Bolsas vacías se utilizaron como blancos. Los compuestos volátiles se eluyeron de las trampas con 150  $\mu\text{l}$  de diclorometano, conteniendo 5 ng. $\mu\text{l}^{-1}$  de dodecano (C12; Sigma-Aldrich) como estándar interno. Las muestras se colocaron en los viales que se utilizaron para su posterior análisis mediante cromatografía de gases asociado a un espectro de masa (GC-MS). Los viales se mantuvieron en frío (-20 °C) con cinta de teflón para su mayor conservación hasta el momento de la medición.



**Figura 12.** Detalle de la colecta de los VOCs emitidos por las plantas de *S. habrochaites*.

## 8. Cromatografía de gases (GC-MS)

Las muestras se analizaron con un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A) equipado con un detector de masa (Agilent 5977). Se utilizó una columna capilar J&W de 30 m HP1-



MS (0,25 mm de i.d., espesor de película de 0,25  $\mu\text{m}$ ). Se inyectaron muestras (1  $\mu\text{l}$ ) a 240 °C en modo *splitless*. Se utilizó helio como gas portador a 0,7 ml por minuto (presión de entrada: 20,48 kPa). La temperatura de la columna se mantuvo a 35 °C durante 1 min y luego se incrementó a una velocidad de 10 °C por min hasta que alcanzó 230 °C. Finalmente, la temperatura se mantuvo a 230 °C durante 15 min. Los compuestos se identificaron comparando el espectro de masa con aquellos provistos por el NIST (National Institute of Standards and Technology) y las bibliotecas de espectros de masas de productos naturales desarrolladas por la Unidad de Investigación Química CMAVE-USDA, y mediante la comparación de los tiempos de retención con estándares auténticos. Los compuestos fueron cuantificados mediante la relación de las áreas debajo de sus picos con el estándar interno y se expresaron en masa equivalente de dicho estándar ( $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ). En el caso del análisis de los VOCs emitidos por las plantas, las concentraciones se dividieron por el peso fresco (g) de la parte aérea de las plantas ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

## 9. Extracción de RNA

Se cosechó una hoja por planta (100 mg) y se molió en un mortero con nitrógeno líquido, luego se transfirió a un tubo *ependorf* con 1 ml de *grinding buffer* y 0,34 ml de ácido fenol:cloroformo (5:1) manteniendo siempre las muestras en hielo para la conservación del RNA. Posteriormente, se homogeneizaron las muestras por inversión y se centrifugaron a 11500 rpm por 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo *ependorf* y el mismo se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se agregaron 0,75 ml de cloroformo, los tubos se agitaron por inversión durante 15 segundos y a continuación se incubaron a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Luego, se centrifugaron a 4 °C durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo *ependorf* y se le agregó 0,25 ml de isopropanol (Sintorgan) frío junto con 0,25 ml de citrato de sodio (0,8 M) más cloruro de sodio (1,2 M). Dicha mezcla se incubó a -20 °C durante una hora y después se precipitó mediante una centrifugación a 11000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 0,5 ml de etanol 70%. Luego, se centrifugó a 9000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Se repitió el lavado con 0,5 ml de etanol 70% y se centrifugó a 9000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se secó con el tubo abierto durante 15 minutos. Al estar suficientemente seco, se resuspendió en 30  $\mu\text{l}$  con agua y se guardó a -70 °C hasta el momento de ser usado.

## 10. Evaluación de la calidad y cuantificación del RNA

Se preparó un gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X (Tris-acetato de 0,04 M, EDTA 1 mM, pH 8,0) con la adición de bromuro de etidio (BrET, 0,0004  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) para verificar la

correcta extracción de RNA. Los geles se fotografiaron bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador. Se utilizó el *NanoDrop* para estimar la cuantificación del RNA, se seleccionaron las muestras que tenían una concentración mayor a  $0,2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Se determinó la pureza mediante la relación de los valores de absorbancia A260/230 y A260/280. Los valores A260/230 y A260/280 sirven para determinar contaminantes, por lo que se seleccionaron las muestras que tenían valores cercanos a 2.

### **11. Tratamiento con DNAsa**

Las muestras fueron tratadas con la enzima DNasa libre de RNasa (Promega), con el fin de degradar el ADN. Se agregó 2  $\mu\text{l}$  de la enzima y 1  $\mu\text{l}$  de buffer TE (Promega) a cada muestra y se las incubó en el termociclador a 37 °C durante 30 minutos y luego a 65 °C durante 10 minutos. A los 29 minutos del primer paso se detuvo el ciclo y se agregó 1  $\mu\text{l}$  de la solución STOP (RQ1 DNase Stop Solution, Promega) con el fin de terminar la reacción de la DNasa.

### **12. Retrotranscripción (RT-PCR)**

Se agregaron 2  $\mu\text{l}$  de oligo dT a las muestras y se colocaron en el termociclador a 70 °C durante 5 minutos. Finalizado el ciclo, las muestras se colocaron en hielo para evitar la formación de estructuras secundarias de RNA. La mezcla de reacción utilizada fue preparada con 1  $\mu\text{l}$  de la enzima RT (Promega), 5  $\mu\text{l}$  de *buffer* M-MLV RT 5X (Promega), 1,25  $\mu\text{l}$  de dATP (10 mM), 1,25  $\mu\text{l}$  de dTTP (10 mM), 1,25  $\mu\text{l}$  de dCTP (10 mM), 1,25  $\mu\text{l}$  de dGTP (10 mM), y agua Mili-Q suficiente para alcanzar un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . Para el ciclado se utilizó una primera etapa de 42 °C durante 60 minutos, seguido por una segunda etapa de 75 °C durante 15 minutos. Una vez finalizada la retrotranscripción, se diluyeron las muestras 1/10 y se realizó un gel de agarosa 1% (descrito en la sección 8) para visualizar la presencia de cDNA.

### **13. Diseño de *primers***

A partir de la base de datos NCBI se obtuvieron las secuencias de los genes de interés en formato FASTA. Luego, se utilizó el programa *Primer3* versión 4.1.0 para diseñar los *primers* adecuados, para esto se seleccionó un rango de temperatura de fusión ( $T_m$ ) de 59-61 °C y un tamaño de producto de un rango de 120 – 150 pares de bases (pb). Para evaluar la calidad del par de *primers* se utilizó el programa *Premier Biosoft*, y se seleccionaron aquellos en que los indicadores estuvieran más cercanos a cero. Los parámetros que se tuvieron en cuenta para la selección fueron los valores de  $\Delta G$  de los dímeros y de las horquillas de los *primers*.

### **14. PCR en tiempo real (*Real time* PCR, q-PCR)**

Se preparó la mezcla de reacción con 4 µl de Master Mix 2X (FastStart Universal SYBR Green Master (ROX), Roche), 0,1 µl del *primer forward* (Fw, 50 µM), 0,1 µl del *primer reverse* (Rv, 50 µM) y agua Mili-Q suficiente para alcanzar un volumen final de 10 µl. Se realizó una dilución 1/10 de las muestras y se agregaron 2 µl en cada reacción. Para cada par de *primers* se realizaron controles negativos en donde se añadió agua Mili-Q y no se agregó muestra. Se utilizó el equipo Agilent ABI 7500 para realizar la PCR en tiempo real. Para el ciclado se utilizó un primer paso de 95°C durante 10 minutos para activar la Taq polimerasa (*Hot Start*). A continuación, se realizaron 40 ciclos de dos temperaturas: 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Luego, se realizó un ciclo de las siguientes etapas: 95 °C durante 15 segundos, seguido por 60 °C durante 1 minuto y por último 95 °C durante 15 segundos. Los niveles de expresión se normalizaron utilizando los niveles de ARNm de SGN (gen de referencia o gen *housekeeping*), y se midió la expresión de la zingibereno sintasa (Zis), la valenceno sintasa (TPS17) y la CPT1 (Tabla 2). Para evaluar la expresión relativa de las enzimas se utilizaron 3 plantas por tratamiento (Amb-C, Amb-MeJA, RL-C y RL-MeJA).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de interés. Se indican los *primers forward* (Fw) y *reverse* (Rv).

Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>SGN Fw</i>	GCTAAGAACGCTGGACCTAATG
<i>SGN Rv</i>	TGGGTGTGCCTTTCTGAATG
<i>Zis Fw</i>	AAGATGCAGCCACAGTACCC
<i>Zis Rv</i>	GTTTTGAAGGGACCATAGCTACC
<i>TPS17 Fw</i>	CGTCGCTCTGGTAGTCATCAT
<i>TPS17 Rv</i>	GAAGGAGCCATCACTAGCATCT
<i>CPT1 Fw</i>	TGCTCGTGGACTCAACAAGA
<i>CPT1 Rv</i>	CCTTTGCCCATCTCCTATTACCA

## 15. Actina como gen de referencia

Se evaluó un par de *primers* del gen actina (Act) diseñados para *S. lycopersicum* como posible gen de referencia para la q-PCR (Tabla 3). Para esto se realizó una PCR que consistió en preparar la mezcla de reacción con 0,5 µl de la polimerasa de ADN PFU (PB-L), 2 µl de *buffer* (PB-L) (10 X), 0,28 µl del *primer reverse* (50 µM), 1 µl de ADN molde, 2 µl de dNTPs (2 mM) y agua Mili-Q suficiente para alcanzar un volumen final de 20 µl. Se utilizó como control positivo una muestra de *S. lycopersicum* y como control negativo una reacción sin muestra. Luego, se realizó una primera etapa de 94 °C durante 2 minutos, seguido por 40 ciclos de las siguientes etapas: 92 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 15 segundos y 68 °C durante 30 segundos. A continuación, se realizó un gel de agarosa 1% (descrito en la sección 8) para verificar si hubo amplificación del gen.

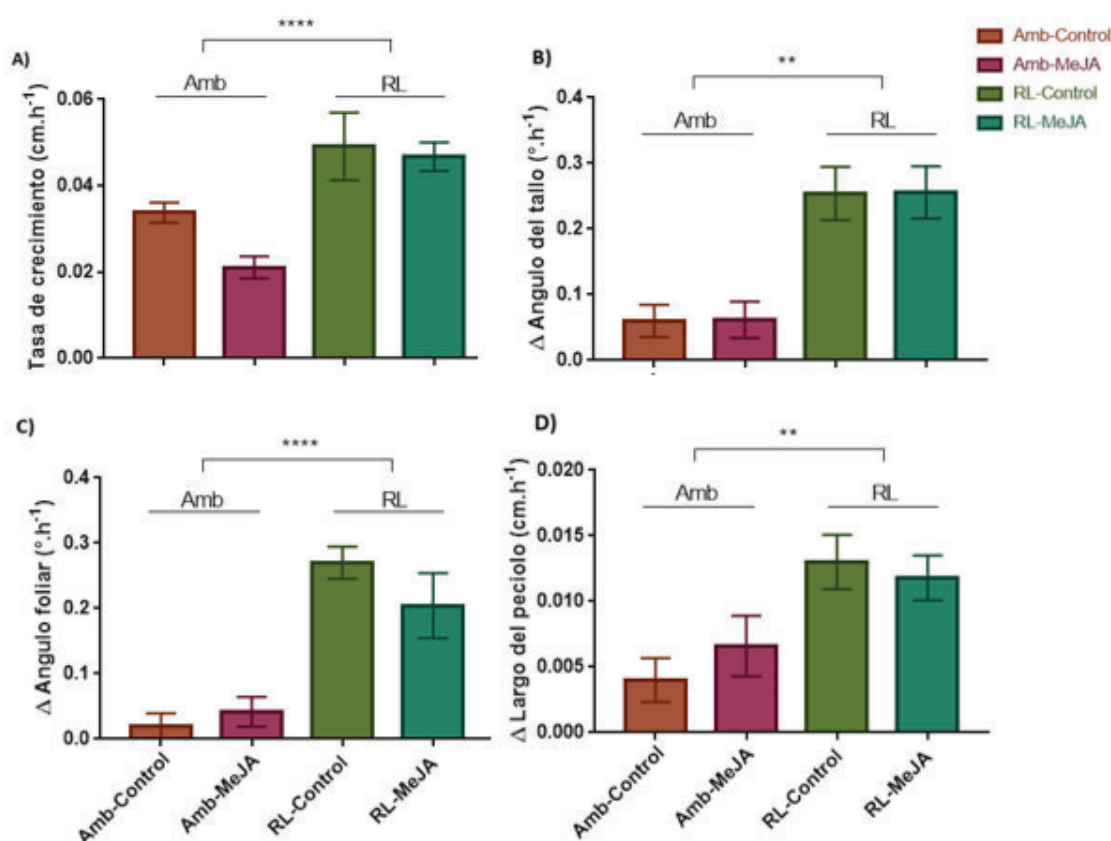
**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen actina (Act). Se indican los *primers forward* (Fw) y *reverse* (Rv).

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
<i>Act Fw</i>	GGTCCCTCTATTGTCCACAG
<i>Act Rv</i>	TGCATCTCTGGTCCAGTAGGA

## Resultados

### 1. Respuesta al escape al sombreado

Con el fin de corroborar el efecto del tratamiento de luz ambiente enriquecido con RL, se evaluaron los parámetros característicos del SAS. Los resultados demostraron que efectivamente las plantas de *S. habrochaites* expresaron el síndrome de escape al sombreado. En este sentido, la tasa de crecimiento fue mayor en aquellas plantas tratadas con RL respecto a su control en luz ambiente (Luz:  $P < 0.0001$ ; Fig. 13A). En el caso del ángulo del tallo, se observó que el tratamiento con RL tiene un efecto significativo, por lo que la planta tiende a alejarse de la fuente de luz que simula la competencia (Luz:  $P = 0.005$ ; Fig. 13B). Al medir el ángulo foliar y el largo del peciolo en ambos casos se observó un efecto del RL significativo (Luz:  $P < 0.0001$  y  $P = 0.002$ , respectivamente), por lo que hubo una elevación de las hojas, una típica respuesta fenotípica que le permite a las plantas eficientizar la captación de luz (Fig. 13C y Fig. 13D).

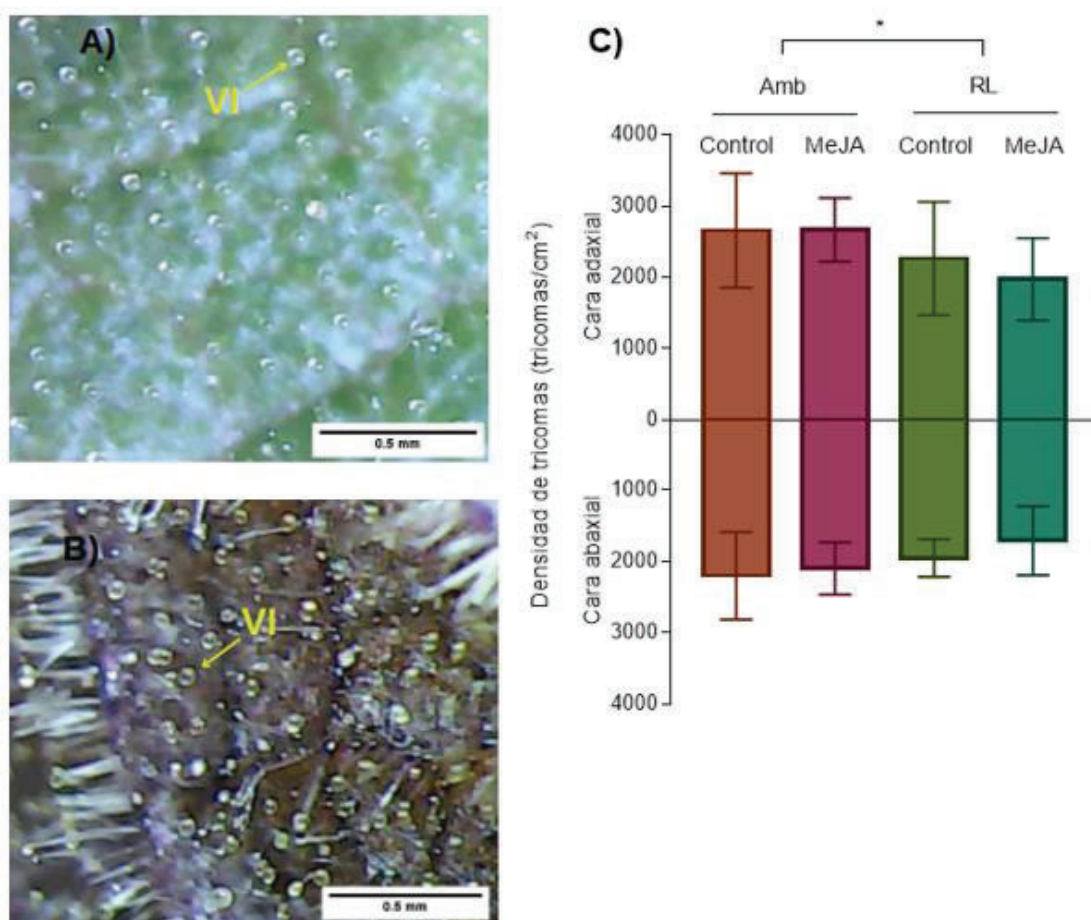


**Figura 13.** Tasas de cambio de los parámetros medidos en plantas jóvenes de *S. habrochaites* (LA2167). Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450  $\mu\text{M}$ ) o con una solución control sin MeJA (Control), en condiciones de luz blanca (Amb) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL). **A)** Tasa de crecimiento ( $\text{cm.h}^{-1}$ ), **B)** cambio del ángulo del tallo ( $^{\circ}.\text{h}^{-1}$ ), **C)** cambio del ángulo foliar ( $^{\circ}.\text{h}^{-1}$ ) y **D)** cambio del largo del peciolo ( $\text{cm.h}^{-1}$ ). Los análisis fueron realizados mediante un ANOVA de 2 vías, con un  $n=10$  plantas por tratamiento,

las barras de error representan la media  $\pm$  SEM. \*\* y \*\*\*\* indican diferencias significativas ( $P < 0.01$  y  $P < 0.0001$ , respectivamente).

## 2. Densidad de tricomas

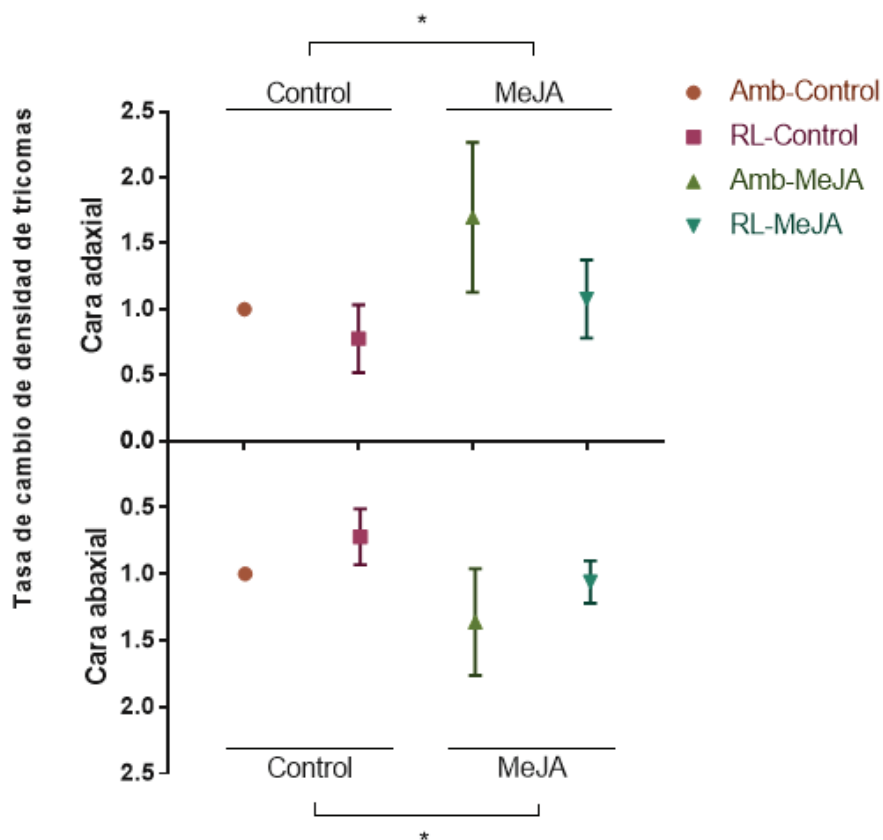
Se midió la densidad de tricomas glandulares tipo VI en respuesta al efecto de la baja relación R:RL y el efecto del MeJA en las plantas de *S. habrochaites* (Fig. 14). Se compararon las densidades obtenidas de la cara adaxial y abaxial de los folíolos en cada tratamiento, y se encontró que únicamente en el tratamiento Amb-MeJA hubo diferencias significativas, donde la densidad fue mayor en la cara adaxial ( $P=0.122$ ,  $P=0.004$ ,  $P=0.483$  y  $P=0.068$  para Amb-C, Amb-MeJA, RL-C y RL-MeJA, respectivamente). Al analizar el efecto de los tratamientos, en ambas caras se observó que no hubo interacción entre los factores (Luz x MeJA:  $P=0.536$  y  $P=0.698$ ; adaxial y abaxial, respectivamente), y tampoco se observó un efecto significativo del MeJA (MeJA:  $P=0.594$  y  $P=0.352$ ; cara adaxial y abaxial, respectivamente). El principal efecto fue el de la luz, sin embargo, este efecto solo fue significativo en la cara adaxial (Luz:  $P=0.047$  y  $P=0.091$ ; cara adaxial y abaxial, respectivamente) (Fig. 14C).



**Figura 14.** A) Fotografía de la cara adaxial y B) de la abaxial de plantas jóvenes de *S. habrochaites* (LA2167) observadas mediante una lupa binocular (50X) en donde se señalan los tricomas glandulares tipo VI. C) Densidad de tricomas glandulares tipo VI (tricomas.cm<sup>-2</sup>)

medidas en la cara adaxial y abaxial en plantas jóvenes de *S. habrochaites* (LA2167). Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450  $\mu$ M) o con una solución control sin MeJA (Control), en condiciones de luz blanca (Amb) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL). El análisis fue realizado mediante un ANOVA de 2 vías, n=6 plantas por tratamiento, las barras de error representan la media  $\pm$  DE. \*, \*\*, \*\*\* y \*\*\*\* indican diferencias significativas (P<0.05, P<0.01, P<0.001 y P<0.0001, respectivamente).

Se midió también la densidad de tricomas glandulares tipo VI a los 8 días de la aplicación de MeJA (Fig. 15). Las densidades de los tratamientos RL-C, Amb-MeJA y RL-MeJA se relativizaron a las densidades del tratamiento Amb-C para ambas caras de los folíolos con el fin de evaluar la tasa de cambio respecto a este tratamiento. Al igual que en el caso anterior, se compararon las densidades obtenidas entre la cara adaxial y abaxial, pero no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (P=0.077, P=0.382, P=0.228 y P=0.290 para Amb-C, RL-C, Amb-MeJA y RL-MeJA, respectivamente). Al analizar el efecto de los tratamientos se observó que no hubo una interacción significativa entre los factores en ninguna de las caras (Luz x MeJA: P= 0.328 y P= 0.941; cara adaxial y abaxial, respectivamente). En el caso de los tratamientos con RL, tanto en la cara adaxial como en la cara abaxial se puede observar que hay una tendencia en donde se obtuvo una menor densidad de tricomas, sin embargo, el efecto del RL no fue significativo (Luz: P= 0.056 y P= 0.058; cara adaxial y abaxial, respectivamente). Tanto en la cara adaxial como en la cara abaxial se observó un aumento de las densidades para los tratamientos Amb-MeJA y RL-MeJA respecto al tratamiento Amb-C, y se obtuvo un efecto del MeJA significativo (MeJA: P= 0.029 y P= 0.028; adaxial y abaxial, respectivamente).

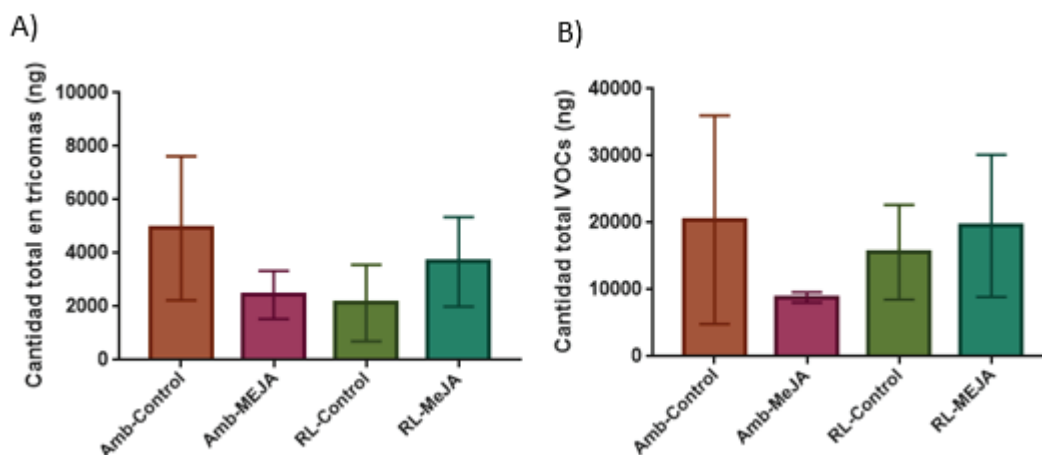


**Figura 15.** Tasa de cambio de densidad de tricomas glandulares tipo VI medidas en la cara adaxial y abaxial en plantas jóvenes de *S. habrochaites* (LA2167) a los 8 días de la aplicación de MeJA. Las densidades de los tratamientos RL-C, Amb-MeJA y Amb-C fueron relativizadas al tratamiento Amb-C. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450  $\mu$ M) o con una solución control sin MeJA (Control), en condiciones de luz blanca (Amb) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL). El análisis fue realizado mediante un ANOVA de 2 vías, n=3 plantas por tratamiento, las barras de error representan la media  $\pm$  DE. \*, \*\*, \*\*\* y \*\*\*\* indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  y  $P < 0.0001$ , respectivamente).

### 3. Cantidad total de terpenos

Se midió y cuantificó la cantidad de terpenos presentes en los tricomas glandulares tipo VI y la cantidad total de VOCs emitidos en el espacio aéreo de las plantas para los distintos tratamientos. A partir del análisis estadístico de la cantidad total de terpenos acumulados en los tricomas glandulares tipo VI, se obtuvo un valor de interacción significativo (Luz x MeJA:  $P = 0.022$ ; Fig. 16A). En el caso de la cantidad total de VOCs emitidos por las plantas, no se obtuvo un valor significativo de interacción de los factores (Luz x MeJA:  $P = 0.192$ ), ni un efecto significativo de ninguno de los factores (Luz:  $P = 0.611$ , MeJA:  $P = 0.509$ ; Fig. 16B). Esto implica que la cantidad total de VOCs emitidos por las plantas no se vio afectada por los distintos tratamientos.

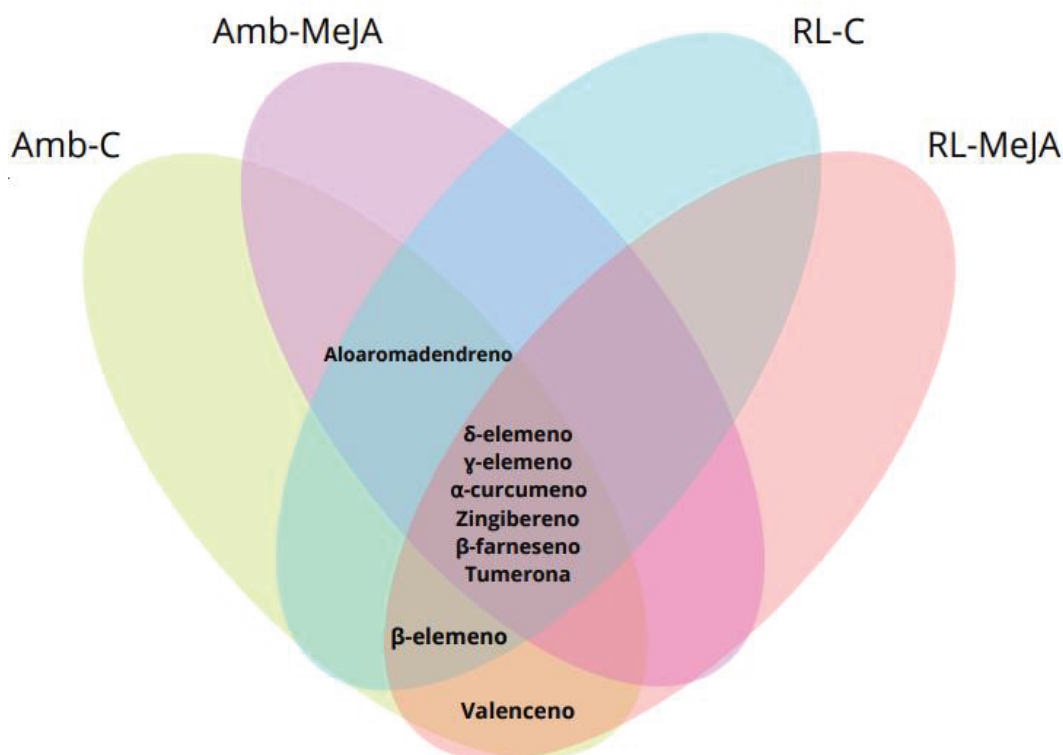




**Figura 16. A)** Cantidad total de terpenos en los tricomas glandulares tipo VI (ng) y **B)** cantidad total de VOCs (ng) emitidos durante 3 horas de colección medidos en plantas jóvenes de *S. habrochaites* (LA2167) en los distintos tratamientos. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450  $\mu$ M) o con una solución control sin MeJA (Control), en condiciones de luz blanca (Amb) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL). El análisis fue realizado mediante un ANOVA de 2 vías, n=5 plantas por tratamiento, las barras de error representan la media  $\pm$  DE.

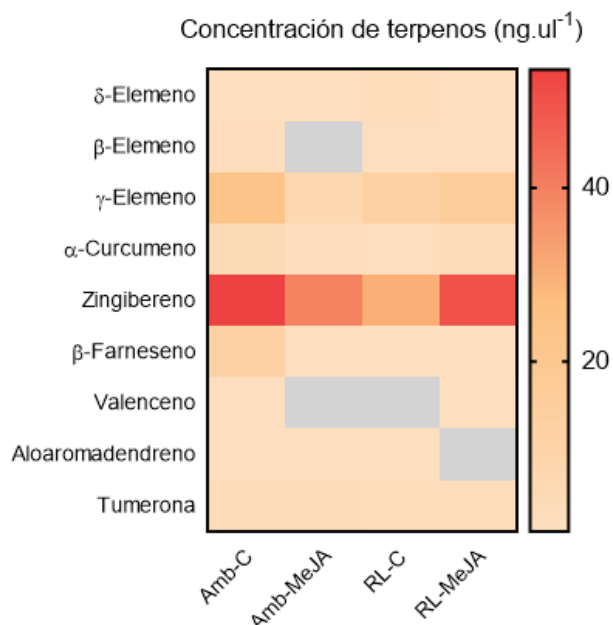
#### 4. Acumulación de terpenos en tricomas glandulares tipo VI

Se evaluó el efecto de la baja relación R:RL y la simulación de herbivoría en la acumulación/composición de terpenos en tricomas glandulares tipo VI de las plantas de *S. habrochaites* (LA2167). En la figura 17 se observan los distintos terpenos presentes en los diferentes tratamientos analizados. Se encontraron seis terpenos que estuvieron presentes en todos los tratamientos, estos son:  $\delta$ -elemeno,  $\gamma$ -elemeno,  $\alpha$ -curcumeno, zingibereno,  $\beta$ -farneseno y tumerona. El  $\beta$ -elemeno fue encontrado solamente en los tricomas glandulares tipo VI de las plantas bajo los tratamientos Amb-C, RL-C y RL-MeJA. El aloaromadendreno estuvo presente en los tratamientos RL-C, Amb-C y Amb-MeJA, mientras que el sesquiterpeno valenceno fue encontrado únicamente en los tratamientos Amb-C y RL-MeJA.



**Figura 17.** Diagrama que muestra los terpenos acumulados en los tricomas glandulares tipo VI en hojas de plantas jóvenes de *S. habrochaites* (LA2167) en los distintos tratamientos. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450  $\mu$ M) o con una solución control sin MeJA (Control), en condiciones de luz blanca (Amb) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL). Se indican en negrita los sesquiterpenos.

En las cavidades de los tricomas glandulares tipo VI de las plantas de *S. habrochaites* únicamente se encontraron sesquiterpenos. A partir del análisis cualitativo de la composición de terpenos en los tricomas, se observó que el *zingibereno* es uno de los sesquiterpenos que está presente en todos los tratamientos y el que se encontró en mayor concentración, seguido por el *γ-elemeno* (Fig. 18). Se puede observar también que no difiere en gran medida el número de terpenos identificados en cada tratamiento, en el tratamiento de Amb-C se identificaron 9 terpenos, en el tratamiento Amb-MeJA 7, en el tratamiento RL-C 8 y en el tratamiento RL-MeJA 8.



**Figura 18.** Mapa de calor (*heatmap*) de las concentraciones de terpenos en tricomas (ng.μl<sup>-1</sup>) obtenidas a partir de tricomas glandulares tipo VI en hojas de plantas jóvenes de *S. habrochaites* (LA2167) en los distintos tratamientos. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450 μM) o con una solución control sin MeJA (Control), en condiciones de luz blanca (Amb) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL). Se representa en distintas tonalidades de rojo las concentraciones (ng.μl<sup>-1</sup>) y en gris la ausencia del terpeno.

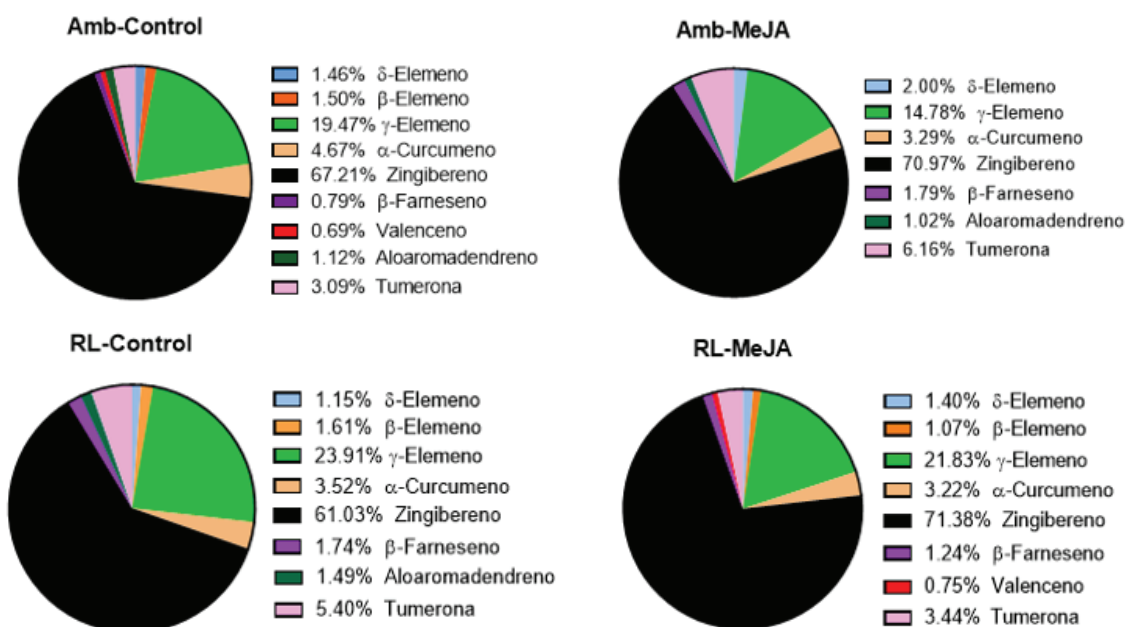
Con respecto a las concentraciones obtenidas en las cavidades de los tricomas glandulares tipo VI de los terpenos, se puede observar que para la mayoría de los terpenos no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Tabla 4). Al realizar el análisis estadístico se obtuvo un valor de interacción significativo para los sesquiterpenos *β-elemeno*, *zingibereno* y *valenceno* (Luz x MeJA: P=0.018, P=0.017 y P=0.001, respectivamente). En el caso del *β-elemeno*, se detectó en todos los tratamientos excepto en el Amb-MeJA, obteniendo una mayor concentración en el tratamiento Amb-C ( $1.27 \pm 0.47$  ng.μl<sup>-1</sup>). Con respecto al *zingibereno*, se detectó en los cuatro tratamientos y, al igual que en el caso anterior, se obtuvo una mayor concentración en el tratamiento Amb-C y una menor concentración en el tratamiento RL-C. En el caso del *valenceno*, únicamente se detectó en los tratamientos Amb-C y RL-MeJA, con valores similares ( $0.58 \pm 0.06$  ng.μl<sup>-1</sup> y  $0.41 \pm 0$  ng.μl<sup>-1</sup>, respectivamente). Para los tres terpenos mencionados, se obtuvieron concentraciones más altas en los tratamientos Amb-C y RL-MeJA.

**Tabla 4:** Concentración de terpenos en tricomas glandulares tipo VI, expresada en ng.μl<sup>-1</sup>. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de MeJA (450 μM) o con una solución control (sin MeJA), en condiciones de luz blanca (Amb) y enriquecida con rojo lejano (RL). Se indica el P-valor obtenido para la interacción luz x hormona (Luz x MeJA); para el efecto de la hormona (MeJA) y para el efecto de la luz (Luz).

Terpeno	Tratamientos				P-valor		
	Amb-C	Amb-MeJA	RL-C	RL-MeJA	Luz x MeJA	MeJA	Luz
$\delta$ -Elemeno	1,23 $\pm$ 0,55 a	0,84 $\pm$ 0,34 a	0,25 $\pm$ 0,27 a	0,77 $\pm$ 0,46 a	9,802E-02	7,885E-01	6,064E-02
<b><math>\beta</math>-Elemeno</b>	1,27 $\pm$ 0,47 a	0 b	0,26 $\pm$ 0,37 ab	0,59 $\pm$ 0 ab	<b>0,018</b>	0,145	0,973
$\gamma$ -Elemeno	16,37 $\pm$ 10,87 a	6,23 $\pm$ 7,18a	7,55 $\pm$ 5,80 a	7,70 $\pm$ 8,01 a	0,179	0,191	0,330
$\alpha$ -Curcumeno	2,90 $\pm$ 1,58 a	1,00 $\pm$ 0,70 a	1,54 $\pm$ 1,16 a	1,77 $\pm$ 1,30 a	0,070	0,146	0,597
<b>Zingibereno</b>	56,50 $\pm$ 28,21 a	29,90 $\pm$ 14,51 ab	19,67 $\pm$ 14,80 b	39,90 $\pm$ 16,98 ab	<b>0,017</b>	0,691	0,134
$\beta$ -Farneseno	0,66 a	0,75 $\pm$ 0,14 a	0,56 $\pm$ 0,28 a	0,68 a	0,936	0,603	0,393
<b>Valenceno</b>	0,58 $\pm$ 0,06 a	0 b	0 b	0,41 $\pm$ 0 a	<b>0,001</b>	0,134	<b>0,006</b>
Aloaromadendreno	0,63 $\pm$ 0,58 a	0,43 $\pm$ 0,18 a	0,48 $\pm$ 0,22 a	0 a	0,575	0,200	0,304
Tumerona	2,60 $\pm$ 0,60 a	2,60 $\pm$ 0,60 a	1,74 $\pm$ 0 a	1,89 $\pm$ 0,20 a	0,843	0,871	0,131

Se realizaron mediciones independientes de 5 plantas por tratamiento, los valores indican la media  $\pm$  DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos (Amb-C, Amb-MeJA, RL-C y RL-MeJA) para cada compuesto. En negrita se indican los tratamientos significativos ( $P \leq 0.05$ ).

Al analizar la concentración relativa de los terpenos en las cavidades de los tricomas, se observó que el *zingibereno* fue el terpeno con una mayor proporción en todos los tratamientos (Fig. 19). Se obtuvieron diferencias significativas en todos los tratamientos al comparar su concentración relativa con los distintos terpenos presentes en cada tratamiento (Ver Anova Fig. S1, S2, S3 y S4, Anexo I). Los sesquiterpenos *zingibereno* y  *$\gamma$ -elemeno* fueron detectados en una mayor proporción y mantuvieron su concentración relativa en los distintos tratamientos. Igualmente, la aplicación de MeJA favoreció la proporción del *zingibereno*, ya que se obtuvieron porcentajes mayores en comparación con los tratamientos control (67.21%, 61.30%, 70.97% y 71.38% para los tratamientos Amb-C, RL-C, Amb-MeJA y RL-MeJA, respectivamente).

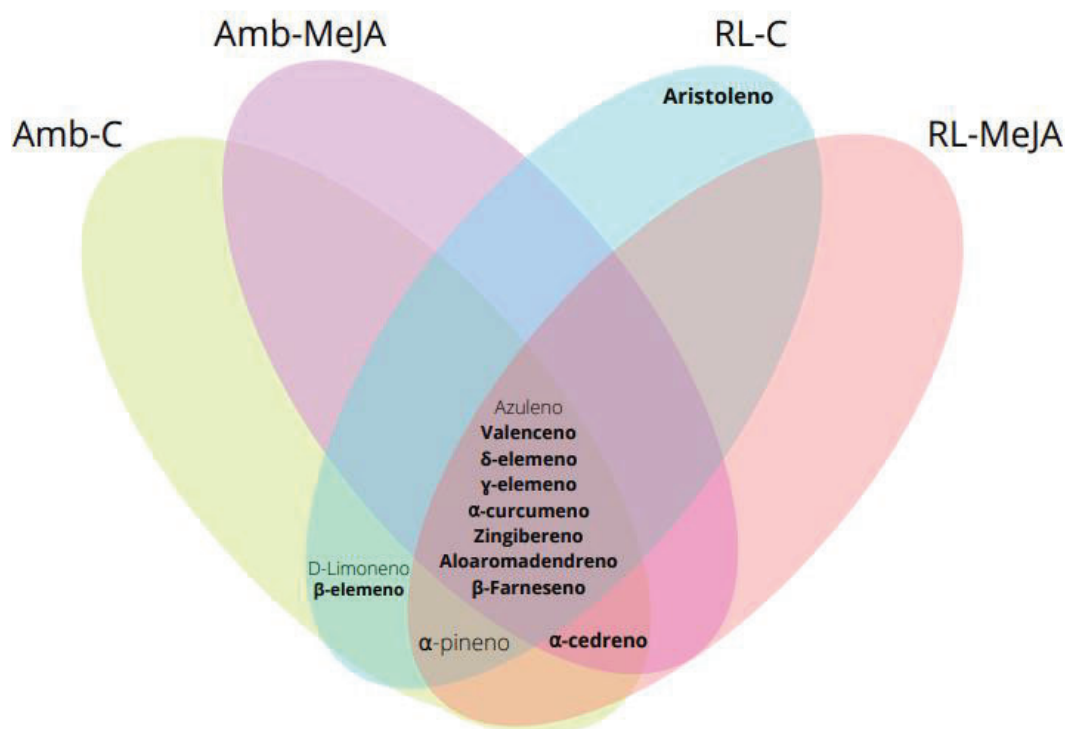


**Figura 19.** Concentración relativa de terpenos (% , ng. $\mu$ l<sup>-1</sup> de cada compuesto/compuestos totales) en las cavidades de los tricomas glandulares tipo VI en hojas de plantas jóvenes de *S. habrochaites* (LA2167) en los distintos tratamientos. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de

Metil Jasmonato (MeJA, 450  $\mu\text{M}$ ) o con una solución control sin MeJA (Control), en condiciones de luz blanca (Amb) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL). El análisis fue realizado mediante un ANOVA de 1 vía,  $n=5$  plantas por tratamiento.

## 5. Emisión de VOCs

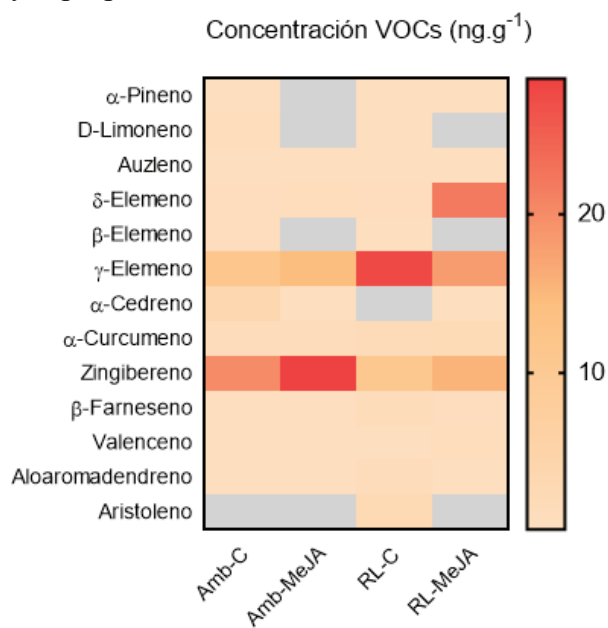
Se procedió a evaluar si el efecto de la baja relación R:RL y la simulación de herbivoría generaba una variación en los terpenos emitidos por las plantas de *S. habrochaites*. En una primera aproximación cualitativa, se detectaron ocho terpenos que se emitieron en todos los tratamientos, estos son: *azuleno*, *valenceno*,  *$\delta$ -elemeno*,  *$\gamma$ -elemeno*,  *$\alpha$ -curcumeno*, *zingibereno*, *aloaromadendreno* y  *$\beta$ -farneseno* (Fig. 20). El  *$\alpha$ -pineno* fue emitido por las plantas bajo los tratamientos Amb-C, RL-C y RL-MeJA. El  *$\alpha$ -cedreno* fue emitido en los tratamientos de Amb-C, Amb-MeJA y RL-MeJA. El *D-limoneno* y el  *$\beta$ -elemeno* fueron emitidos en los tratamientos Amb-C y RL-C. El *aristoleno* fue únicamente emitido por las plantas bajo el tratamiento Amb-C (Fig. 20).



**Figura 20.** Diagrama en donde se observan los VOCs emitidos por plantas jóvenes de *S. habrochaites* LA 2167 en los distintos tratamientos. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450  $\mu\text{M}$ ) o con una solución control sin MeJA (Control), en condiciones de luz blanca (Amb) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL). Se indican en negrita los sesquiterpenos.

El perfil de VOCs estuvo compuesto principalmente por sesquiterpenos, aunque también se detectaron tres monoterpenos. Al analizar las concentraciones de los VOCs emitidos, se puede observar que los sesquiterpenos  *$\gamma$ -elemeno* y *zingibereno* son los mayormente

emitidos y están presentes en los cuatro tratamientos (Fig. 21). Se observaron variaciones en las concentraciones de determinados terpenos, pero también es importante considerar el conjunto de terpenos emitidos en cada tratamiento. En el tratamiento Amb-C se identificaron un total de 15 terpenos, en el tratamiento Amb-MeJA 10, en el tratamiento RL-C 15 y, por último, en el tratamiento RL-MeJA se detectaron 11 terpenos. En los tratamientos Amb-MeJA y RL-MeJA se identificaron un menor número de terpenos emitidos, por lo que, si bien hay terpenos que se emiten en concentraciones similares entre tratamientos, al haber un menor número de terpenos totales emitidos, se podrían estar emitiendo en una mayor proporción.



**Figura 21.** Mapa de calor (*heatmap*) de las concentraciones de VOCs emitidos (ng.g<sup>-1</sup>) por plantas jóvenes de *S. habrochaites* (LA2167) obtenidas en los distintos tratamientos. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450 μM) o con una solución control sin MeJA (Control), en condiciones de luz blanca (Amb) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL). Se representa en distintas tonalidades de rojo las concentraciones (ng.g<sup>-1</sup>) y en gris la ausencia del terpene.

Al realizar el análisis estadístico de las concentraciones de los VOCs, al igual que el análisis realizado para los terpenos acumulados en los tricomas glandulares tipo VI, se observó que las concentraciones de la mayoría de los terpenos no varían entre los tratamientos (Tabla 5). Se obtuvo una interacción de los tratamientos significativa para los sesquiterpenos *δ-elemeno*, *α-cedreno* y *aristoleno* (Luz x MeJA: P= 3,838E-07, P=0.001 y P= 1,927E-04, respectivamente). En el caso de los terpenos *α-pineno*, *D-limoneno* y *β-elemeno* se obtuvo un efecto significativo del MeJA (MeJA: P=0.026, P= 9,543E-05 y P= 3,978E-04, respectivamente). En el caso del *α-pineno*, se observó una disminución de su concentración al aplicar MeJA, y no se detectaron cantidades significativas de *D-limoneno* y *β-elemeno*. Por último, se obtuvo un efecto de la luz

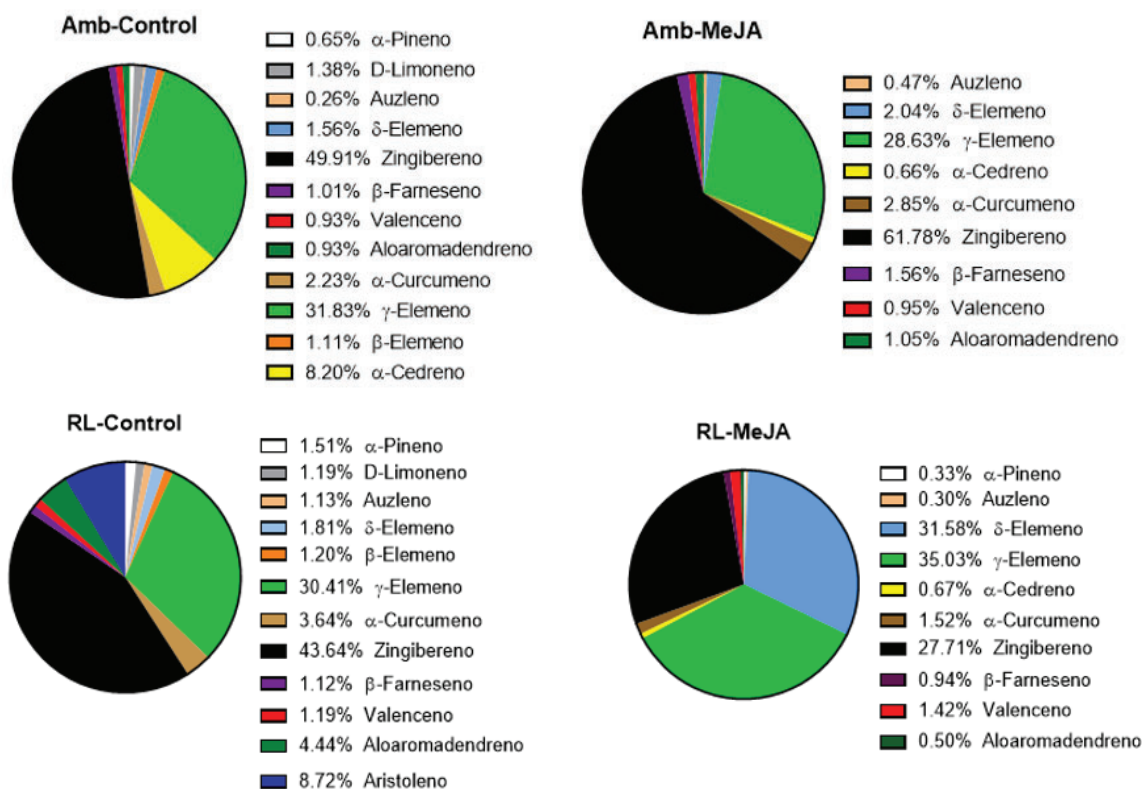
significativo para la concentración del monoterpeno *azuleno* (Luz: P=0.017), en donde el tratamiento con RL favoreció la emisión del mismo.

**Tabla 5:** Concentración de terpenos emitidos (VOCs), expresada en ng.g<sup>-1</sup>. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de MeJA (450 µM) o con una solución control (sin MeJA), en condiciones de luz blanca (Amb) y enriquecida con rojo lejano (RL). Se indica el P-valor obtenido para la interacción luz x hormona (Luz x MeJA); para el efecto de la hormona (MeJA) y para el efecto de la luz (Luz).

Terpeno	Tratamientos				P-valor		
	Amb-C	Amb-MeJA	RL-C	RL-MeJA	Luz x MeJA	MeJA	Luz
<b>α-Pineno</b>	0,29 ± 0,12 ab	0 b	0,45 ± 0,21 a	0,23 ± 0,01 ab	0,717	<b>0,026</b>	0,069
<b>D-Limoneno</b>	0,61 ± 0,39 a	0 b	0,36 ± 0,09 a	0 b	0,205	<b>9,543E-05</b>	0,903
<b>Azuleno</b>	0,11 ± 0,07 b	0,22 ± 0,07 ab	0,34 ± 0,16 a	0,21 ± 0,04 ab	0,055	0,754	<b>0,017</b>
<b>δ-Elemeno</b>	0,69 ± 0,40 b	0,94 ± 0,43 b	0,54 ± 0,21 b	21,8 ± 1,88 a	<b>3,838E-07</b>	<b>5,504E-06</b>	<b>6,439E-05</b>
<b>β-Elemeno</b>	0,49 ± 0,21 a	0 b	0,36 ± 0,17 a	0 b	0,412	<b>3,978E-04</b>	0,608
γ-Elemeno	14,15 ± 11,66 a	13,21 ± 7,53 a	9,14 ± 4,51 a	24,18 ± 11,21 a	0,088	0,230	0,693
<b>α-Cedreno</b>	3,64 ± 0 a	0,31 ± 0,25 b	0 b	0,15 ± 0,27 b	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,005</b>
α-Curcumeno	0,99 ± 0,40 a	1,32 ± 0,78 a	1,09 ± 0,62 a	1,05 ± 0,59 a	0,496	0,539	0,840
Zingibereno	22,19 ± 13,58 a	28,51 ± 24,62 a	13,11 ± 7,74 a	19,13 ± 14,16 a	0,986	0,482	0,351
β-Farneseno	0,45 ± 0,29 a	0,72 ± 0,43 a	0,34 ± 0,14 a	0,65 ± 0,47 a	0,910	0,151	0,578
Valenceno	0,41 ± 0,16 a	0,44 ± 0,30 a	0,36 ± 0,12 a	0,98 ± 0 a	0,063	0,104	0,472
Aloaromadendreno	0,41 ± 0,13 a	0,49 ± 0,28 a	1,33 ± 0,81 a	0,35 ± 0,28 a	0,115	0,187	0,120
<b>Aristoleno</b>	0 b	0 b	2,62 ± 1,29 a	0 b	<b>1,927E-04</b>	0,000	0,000

Se realizaron mediciones independientes de 9 plantas por tratamiento, los valores indican la media obtenida ± DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas (P≤0.05) entre los tratamientos (Amb-C, Amb-MeJA, RL-C y RL-MeJA) para cada compuesto. Se marcaron en negrita los valores de p significativos (P≤0.05).

Al analizar las proporciones de los terpenos en cada tratamiento, se obtuvo una proporción mayor del *zingibereno* y el *γ-elemeno* en comparación con los distintos terpenos presentes, y estas diferencias fueron significativas en todos los tratamientos (Ver Anova Fig. S5, S6, S7 y S8, Anexo II; Fig. 22). En ninguno de los tratamientos se tuvieron diferencias significativas entre el *zingibereno* y el *γ-elemeno* (P=0.351, P=0.281, P=0.761 y P=0.984, para Amb-C, Amb-MeJA, RL-C y RL-MeJA). En el caso del tratamiento RL-MeJA se obtuvo una proporción del 31.58% para el *δ-elemeno* y se obtuvieron diferencias significativas al compararlo con los distintos terpenos obtenidos en el tratamiento, excepto con el *zingibereno* y el *γ-elemeno* (P=0.999 y P=1.000, respectivamente). Se obtuvo una proporción mayor de *zingibereno* en el tratamiento Amb-MeJA (61.78%) en comparación con los otros tratamientos (49.91%, 43.64% y 27.71% para los tratamientos Amb-C, RL-C y RL-MeJA, respectivamente). Al analizar las proporciones de *γ-elemeno*, las mismas se mantuvieron relativamente equitativas entre los distintos tratamientos (31.83%, 30.41%, 28.63% y 35.03% para los tratamientos Amb-C, RL-C, Amb-MeJA y RL-MeJA, respectivamente).

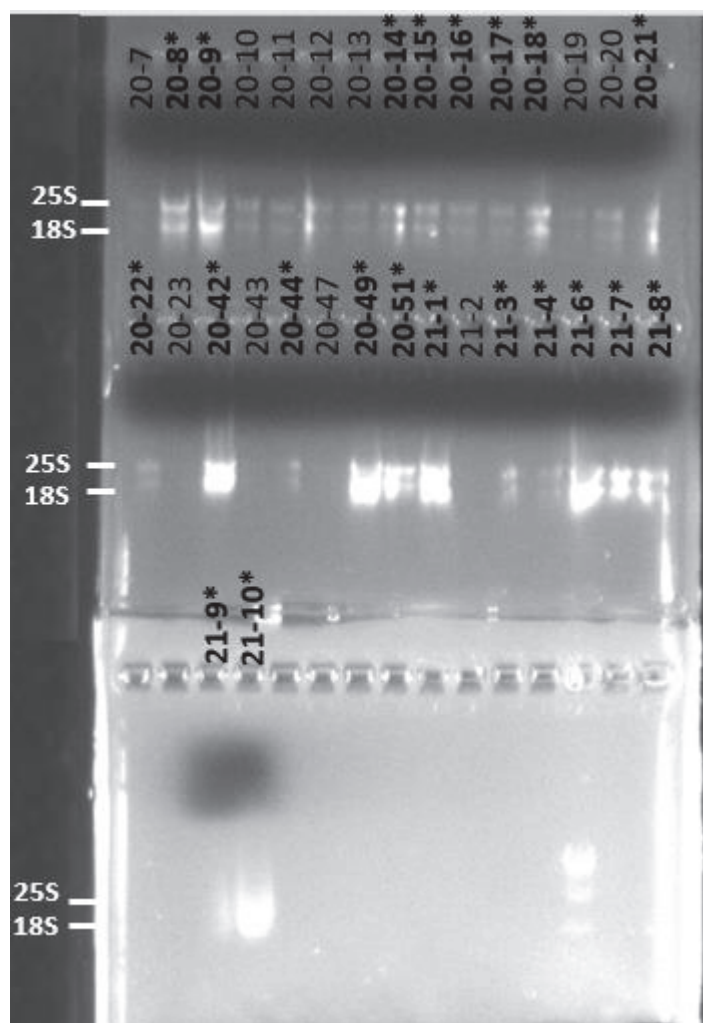


**Figura 22.** Concentración relativa de terpenos (% , ng.g<sup>-1</sup> de cada compuesto/compuestos totales) liberados en forma de VOCs por plantas jóvenes de *S. habrochaites* (LA2167) en los distintos tratamientos. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450  $\mu$ M) o con una solución control sin MeJA (Control), en condiciones de luz blanca (Amb) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL). El análisis fue realizado mediante un ANOVA de 1 vía, n=9 plantas por tratamiento.

## 6. Evaluación de la calidad y cuantificación del RNA

En la figura 23 se pueden observar las bandas que representan el RNA de las distintas muestras, dichas bandas representan el ARN ribosómico 25S y 18S. A partir de los valores obtenidos en la tabla 6 y de los resultados del gel se seleccionaron las muestras que se utilizaron para realizar la retrotranscripción. Se seleccionaron las muestras que tenían una concentración mayor a 0,2  $\mu$ g. $\mu$ l<sup>-1</sup>, valores de A260/230 y A260/280 cercanos a 2 y que se podían visualizar en el gel de agarosa. En total, se seleccionaron 21 muestras para proseguir con la retrotranscripción (marcadas con asteriscos en la Fig. 23 y en la Tabla 6), estas fueron: 5 muestras de RL-C, 8 muestras de Amb-C, 4 muestras de RL-MeJA y 4 muestras de Amb-MeJA.





**Figura 23.** Gel de agarosa realizado para visualizar las muestras de RNA obtenidas de hojas de plantas de *S. habrochaites* (LA2167). El asterisco (\*) indica las muestras que se seleccionaron para realizar la retrotranscripción.

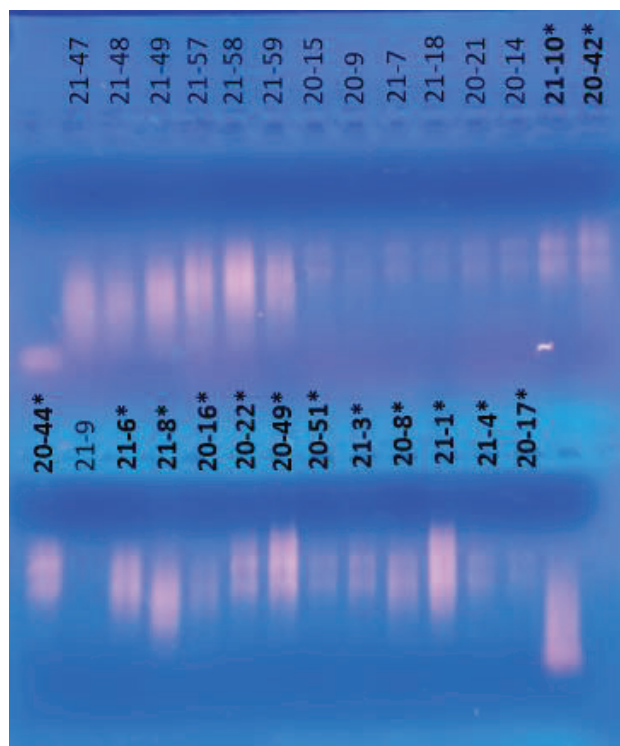
**Tabla 6.** Valores de concentración ( $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) de RNA. Relación A260/A280 y A260/A230 obtenidos para las muestras procesadas. El asterisco (\*) indica las muestras que se seleccionaron para realizar la retrotranscripción.

Muestra	Tratamiento	Concentración ( $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ )	A260/A280	A260/A230
20-7	RL-C	0,117	1,63	0,42
<b>20-8*</b>	RL-C	0,790	2,12	1,74
<b>20-9*</b>	RL-C	0,211	2,07	0,95
20-10	RL-C	0,200	1,99	0,54
20-11	RL-C	0,194	1,93	0,65
20-12	Amb-C	0,193	1,92	0,73
20-13	Amb-C	0,126	1,98	0,48
<b>20-14*</b>	Amb-C	0,392	1,84	0,48
<b>20-15*</b>	Amb-C	0,848	1,97	0,41

<b>20-16*</b>	Amb-C	0,420	2,08	1,14
<b>20-17*</b>	RL-MeJA	1,577	1,81	1,23
<b>20-18*</b>	RL-MeJA	0,217	1,83	1,50
20-19	RL-MeJA	0,098	1,97	0,39
20-20	RL-MeJA	0,196	1,99	0,35
<b>20-21*</b>	Amb-MeJA	0,358	1,44	0,6
<b>20-22*</b>	Amb-MeJA	0,914	1,84	0,35
20-23	Amb-MeJA	0,364	1,86	1,21
<b>20-42*</b>	RL-MeJA	0,561	1,88	0,70
20-43	RL-MeJA	0,075	2,15	1,00
<b>20-44*</b>	RL-MeJA	1,688	2,01	1,61
20-47	Amb-MeJA	0,029	2,01	0,18
<b>20-49*</b>	Amb-MeJA	0,809	1,72	0,99
<b>20-51*</b>	Amb-MeJA	0,979	1,60	1,08
<b>21-1*</b>	RL-C	0,480	1,91	1,40
21-2	RL-C	0,005	2,96	2,96
<b>21-3*</b>	RL-C	0,519	1,87	0,99
<b>21-4*</b>	RL-C	1,339	2,12	1,69
<b>21-6*</b>	Amb-C	1,329	2,16	1,86
<b>21-7*</b>	Amb-C	1,001	2,05	0,92
<b>21-8*</b>	Amb-C	1,806	2,11	1,89
<b>21-9*</b>	Amb-C	1,153	2,26	1,61
<b>21-10*</b>	Amb-C	0,429	2,14	2,00

## 7. Visualización del cDNA

A partir de las muestras de cDNA diluídas 1/10 se realizó un gel de agarosa para seleccionar las muestras de mayor calidad para la posterior q-PCR. Se seleccionaron 4 muestras de Amb-C, 4 muestras de RL-C, 3 muestras de Amb-MeJA y 3 muestras de RL-MeJA (marcadas con asteriscos en la Fig. 24).



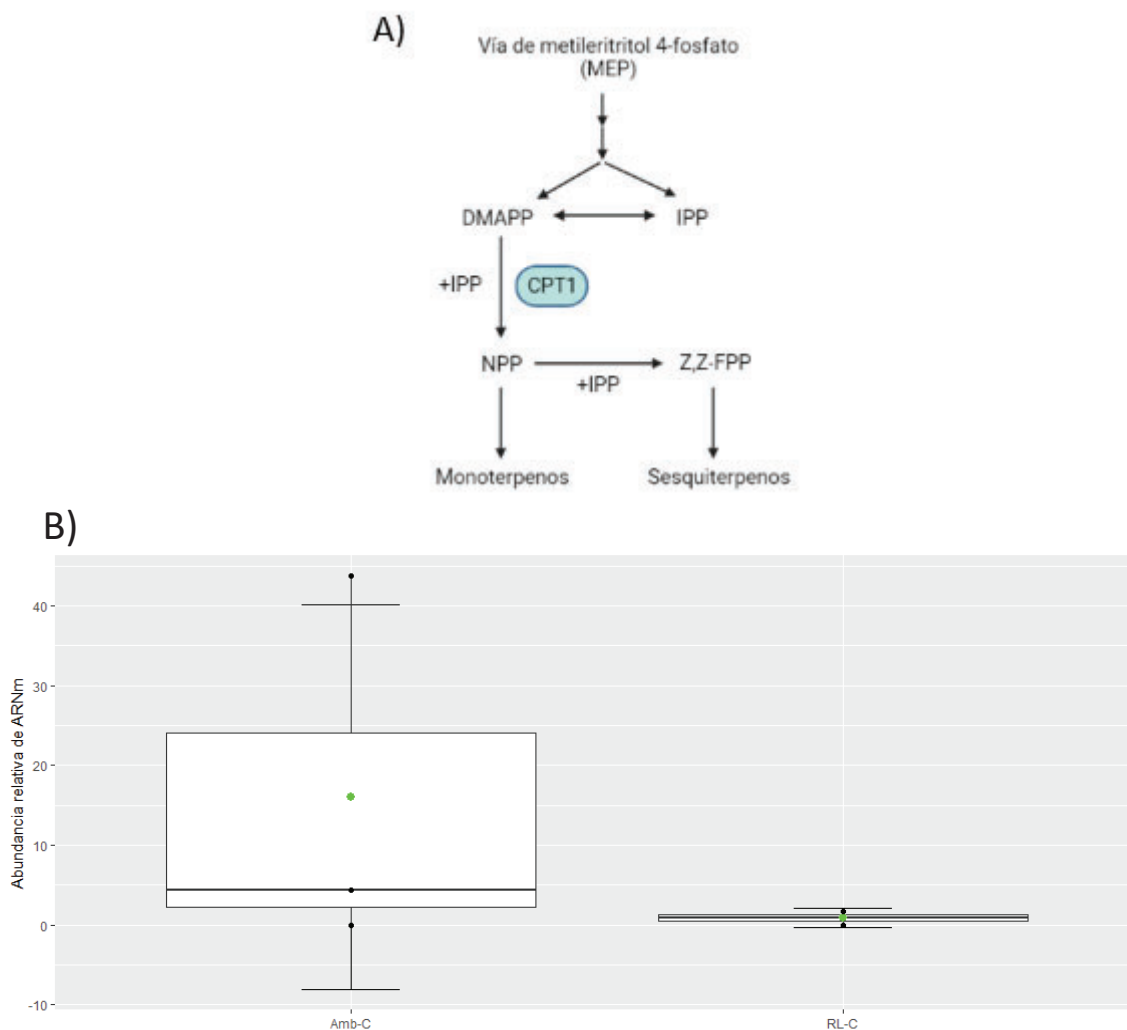
**Figura 24.** Gel de agarosa realizado para visualizar las muestras de cDNA, obtenidas de hojas de plantas de *S. habrochaites* (LA2167). El asterisco (\*) indica las muestras que se seleccionaron para realizar la q-PCR.

## 8. Expresión génica

Al realizar la q-PCR únicamente hubo amplificación del gen de referencia (SGN) en los tratamientos control (sin MeJA), tanto en luz ambiente como en el enriquecido con RL, por lo que únicamente se muestran los resultados obtenidos para dichos tratamientos. Con el objetivo de evaluar al gen actina como gen de referencia para utilizar en la q-PCR, se probaron unos *primers* diseñados para *S. lycopersicum*. Para esto, se realizó una PCR y se visualizó el resultado en un gel de agarosa, pero no hubo amplificación de ninguna de las muestras (resultado no mostrado).

### a. Expresión relativa de CPT1

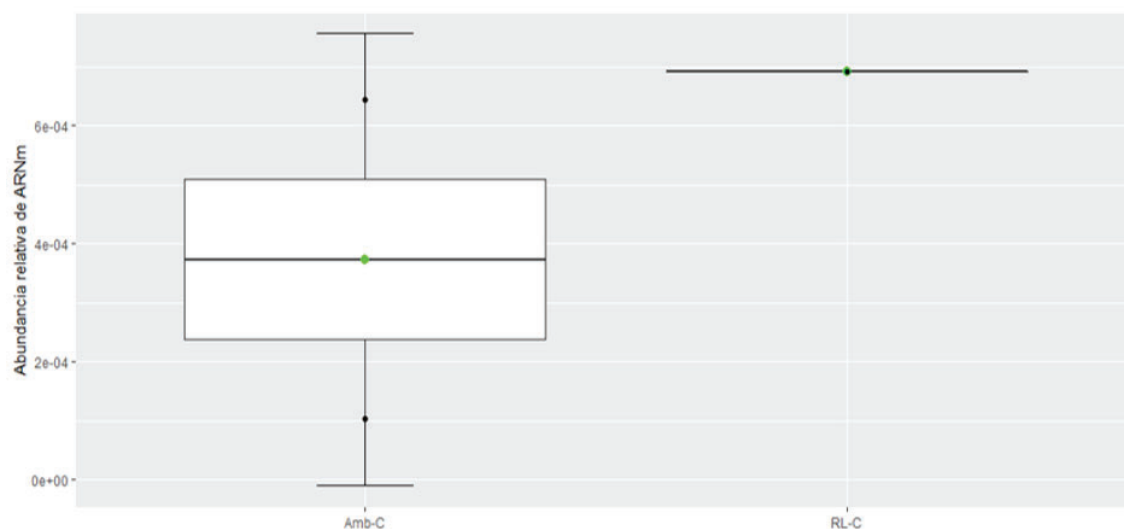
Se determinó la expresión relativa de la enzima cis-preniltransferasa (CPT1) en plantas de *S. habrochaites*. La enzima permite la conversión de dimetilalil difosfato (DMAPP) en neril difosfato (NPP). El NPP es un precursor de los monoterpenos y un sustrato que permite la formación de (2Z,6Z)-farnesil difosfato (Z,Z-FPP), que es un precursor de los sesquiterpenos en *S. habrochaites* (Fig. 25A). Al evaluar la expresión relativa de la enzima CPT1, se puede observar que las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas ( $P=0.460$ ; Fig. 25B).



**Figura 25. A)** Representación esquemática parcial de la vía de biosíntesis de terpenos. Adaptado Zhou et al. (2020). **B)** Abundancia relativa de ARNm de CPT1 para los tratamientos Amb-C y RL-C. El análisis fue realizado mediante un test t, los valores corresponden a un n= 2-3 plantas por tratamiento, las barras horizontales representan la mediana  $\pm$  DE. Las plantas fueron crecidas en condiciones de luz blanca (Amb-C) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL-C).

### **b. Zingibereno sintasa (Zis)**

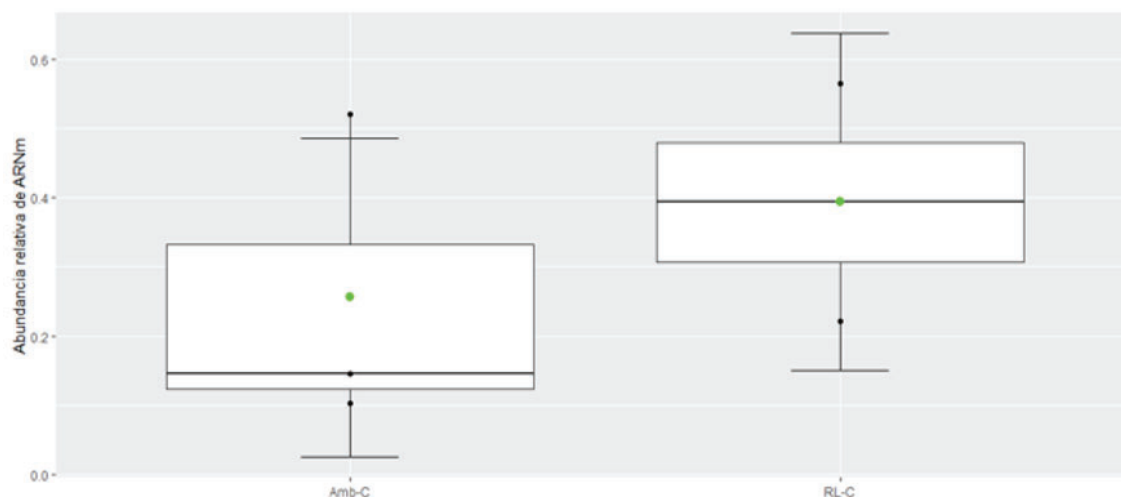
Al analizar la acumulación en los tricomas glandulares tipo VI de *zingibereno* se observó que estuvo en todos los tratamientos y, a partir del análisis estadístico, se obtuvo un valor de interacción significativo entre los factores (Luz x MeJA:  $P=0.017$ ; Tabla 4). El *zingibereno* fue detectado en todos los perfiles de VOCs bajo los distintos tratamientos, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los mismos (Luz:  $P= 0.301$ ; MeJA:  $P= 0.482$ ; Tabla 5). Al realizar la q-PCR se obtuvo amplificación de dos muestras de plantas que fueron expuestas al tratamiento Amb-C y una muestra de una planta tratada con RL-C (Fig. 26). Al tener una única muestra del tratamiento RL-C no se pudo realizar el análisis estadístico.



**Figura 26.** Abundancia relativa de ARNm de la zingibereno sintasa para Amb-C y RL-C, los valores corresponden a un n de 1-2 plantas por tratamiento. Las barras horizontales representan la mediana  $\pm$  DE. Las plantas fueron crecidas en condiciones de luz blanca (Amb-C) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL-C).

### c. Valenceno sintasa (TPS17)

En el caso del *valenceno*, al analizar la acumulación en los tricomas glandulares tipo VI, dicho terpeno fue detectado únicamente en los tratamientos Amb-C y RL-MeJA, y a partir del análisis estadístico realizado se obtuvo una interacción significativa (Luz x MeJA:  $P=0.001$ ; Tabla 4). Sin embargo, al evaluar la emisión del *valenceno*, el mismo fue emitido por las plantas en todos los tratamientos, pero no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones entre los distintos tratamientos, ni un efecto significativo de luz ni de la aplicación de la hormona (Luz:  $P=0.472$ ; MeJA:  $P=0.104$ ; Tabla 5). En el caso de la TPS17, que es la enzima involucrada en la síntesis de *valenceno*, si bien se obtuvo una expresión relativa mayor en el tratamiento RL-C, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.567$ ; Fig. 27).



**Figura 27.** Abundancia relativa de ARNm de TPS17 para los tratamientos Amb-C y RL-C. El análisis fue realizado mediante un test t, los valores corresponden a un n de 2-3 plantas por tratamiento, las barras horizontales representan la mediana  $\pm$  DE. Las plantas fueron crecidas en condiciones de luz blanca (Amb-C) o luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL-C).

## Discusión

En esta tesis nos propusimos investigar el cambio en la composición y emisión de VOCs y la variación en los niveles de expresión génica de las principales enzimas involucradas en la síntesis de terpenos en *S. habrochaites*, con las defensas inducidas y en condiciones de competencia por luz. Los resultados que surgen de esta tesis permiten demostrar, al menos parcialmente, que el efecto del cambio en la calidad de la luz (baja relación R:RL) y la inducción del sistema de defensas (aplicación externa de MeJA) producen una alteración en las defensas de las plantas, generando un cambio en el *blend* de los volátiles emitidos por éstas. La baja relación R:RL lleva a la disminución de la composición y emisión de la mayoría de los terpenos pero la combinación de los factores (RL-MeJA) favorece la emisión de determinados terpenos que participarían en la atracción de insectos predadores de los herbívoros frecuentes de *S. habrochaites*.

### 1. Respuesta de escape al sombreado

Los resultados obtenidos sugieren que para todos los parámetros asociados a la respuesta de escape al sombreado (*i.e.* tasa de crecimiento, ángulo del tallo, ángulo foliar y largo del pecíolo) hay un efecto de la baja relación R:RL (Fig. 13). Esto indica que la inactivación del fitocromo B promueve la respuesta al SAS en las plantas de *S. habrochaites*, y la aplicación de MeJA no inhibe la respuesta al SAS. Por lo que *S. habrochaites*, si bien es una planta silvestre, no es una excepción a la respuesta clásica que presentan especies modelo intolerantes a la sombra, como es el caso de *Arabidopsis thaliana*. En esta especie, se ha reportado que a partir de las 24 horas del inicio del tratamiento con luz RL hay un aumento en la elongación del pecíolo, así como un aumento en el ángulo foliar (respecto al eje horizontal) de las hojas jóvenes en comparación con las tratadas con luz blanca (Ballaré, 2017; Casal, 2012; Sasidharan et al., 2010).

En el marco de la hipótesis de crecer o defenderse, el efecto de la combinación de tratamientos de RL y MeJA inclinó la respuesta hacia el RL y no se observó una inhibición del crecimiento, tal como se ha registrado ya para el tomate comercial *S. lycopersicum* (Cortés et al 2016). En resumen, nuestros resultados indicarían que la inactivación del fitocromo B desencadena las respuestas de SAS independientemente de la activación de la vía del JA por la aplicación de MeJA.

### 2. Densidad de tricomas

Si bien se sabe que *S. habrochaites* tiene una alta densidad de tricomas, y que principalmente tiene tricomas glandulares tipo VI (Bergau et al., 2015), no hay una caracterización que involucre la densidad de ambas caras de la accesión LA2167 y cómo

puede verse afectada por cambios en la relación de R:RL en plantas con las defensas inducidas. Las densidades de tricomas varían según la especie y la accesión, en algunas plantas existen diferencias significativas entre la cara adaxial y abaxial (Antonious, 2001). Nuestros resultados muestran que en condiciones control (sin competencia y sin aplicación de MeJA) no hay diferencias significativas de la densidad entre la cara adaxial y la abaxial en las plantas de *S. habrochaites* LA2167 (Fig. 14C). Las plantas de *S. habrochaites* tienen una mayor productividad metabólica que el tomate comercial, atributo relacionado principalmente a que tienen una mayor densidad de tricomas glandulares tipo VI (Bergau et al., 2015). Se encontraron reportes que estimaron que las plantas de *S. habrochaites* LA1777 tienen una densidad de  $2573 \pm 161$  tricomas.cm<sup>-2</sup> en la cara adaxial de los folíolos, mientras que estimaron una densidad de  $611 \pm 171$  tricomas.cm<sup>-2</sup> en la cara adaxial de plantas de *S. lycopersicum* (Bergau et al., 2015). Esto coincide con lo encontrado en esta tesis, la estimación de la densidad de tricomas glandulares tipo VI de los folíolos de *S. habrochaites* LA2167 demostró que en el tratamiento Amb-C las plantas tienen una densidad de  $2657 \pm 800$  tricomas.cm<sup>-2</sup> en la cara adaxial y una densidad de  $2202 \pm 614$  tricomas.cm<sup>-2</sup> en la cara abaxial (Fig. 14C). Además, en el laboratorio se estimó una densidad de  $886 \pm 385$  tricomas.cm<sup>-2</sup> en la cara adaxial y una densidad de  $432 \pm 79$  tricomas.cm<sup>-2</sup> en la cara abaxial en plantas de *S. lycopersicum* (Manzur et al. manuscrito en preparación). Por lo que nuestros resultados apoyan la evidencia existente respecto a la alta densidad de tricomas glandulares tipo VI que tiene la especie silvestre en comparación con la especie comercial *S. lycopersicum*, lo que contribuye a que tenga una mayor producción de terpenos.

En un principio, al analizar las densidades de tricomas glandulares tipo VI entre los distintos tratamientos, se obtuvo un efecto significativo de la luz (Fig. 14C). Las plantas tratadas con luz RL tuvieron una menor densidad en comparación con las que fueron tratadas con luz ambiente, esto indicaría que la inactivación del fitocromo B podría estar afectando negativamente a la densidad de tricomas glandulares tipo VI, resultado que está en línea con lo descrito para plantas mutantes *phyB1phyB2* de *S. lycopersicum* (cv MoneyMaker LA2706; Cortés et al., 2016). Por el contrario, no se observó ningún efecto de la aplicación de MeJA, es decir que por más que se activó la vía de señalización del JA no se encontraron diferencias en la densidad de tricomas glandulares tipo VI a corto plazo. Esto se puede deber a que el proceso de desarrollo de los tricomas glandulares tipo VI tarde más de 24 horas (tiempo de exposición al MeJA de las plantas). Según bibliografía, en las plantas de menta (*Mentha × piperita*) el proceso de desarrollo del tricoma glandular peltado lleva 60 horas desde el inicio hasta el relleno, y la etapa secretoria ocurre de 20-30 horas después del inicio (G. W. Turner et al., 2000). No hay bibliografía específica respecto a la cinética del desarrollo de los tricomas glandulares tipo VI de *S. habrochaites*, ni del efecto del RL combinado con el efecto de la herbivoría.



Además, existe bibliografía que demuestra que la aplicación exógena de MeJA induce incrementos dramáticos en las densidades de tricomas glandulares tipo VI en hojas nuevas de *S. lycopersicum*, pero estas diferencias son significativas recién a partir de los 7 días de la aplicación (Boughton et al., 2005). Es por eso que se decidió evaluar la densidad de tricomas glandulares tipo VI a los 8 días de la aplicación de MeJA. Al realizar el tratamiento de 8 días se observó un efecto significativo de la aplicación de MeJA, tanto en la cara adaxial como en la cara abaxial (Fig. 15). Esto quiere decir, que la activación de la vía del JA llevó a una mayor densidad de tricomas glandulares tipo VI, mientras que el tratamiento con la luz RL no tuvo ningún efecto significativo. Sin embargo, al analizar los resultados se pudo observar que existe una tendencia del RL a contrarrestar el efecto del MeJA aunque no sea significativo estadísticamente. Entonces, al realizar un tratamiento corto hay un efecto principal del RL, donde hay una menor densidad de tricomas tipo VI al simular la competencia entre plantas. Al realizar un tratamiento prolongado, el efecto de la aplicación del MeJA predomina frente al tratamiento de luz. Es decir, que la activación de la vía del JA promueve un aumento en la densidad de tricomas glandulares tipo VI, pero igualmente se evidencia una tendencia del RL a contrarrestar dicho efecto, por más que no sea significativo.

### **3. Cantidad total de terpenos**

A partir de la recolección de las cabezas de los tricomas glandulares tipo VI y de los VOCs emitidos, se realizó un análisis de la cantidad de terpenos totales tanto acumulados en las cavidades de los tricomas como emitidos por las plantas (Fig. 16). El fin de este análisis (sin considerar la identidad de los terpenos) fue evaluar si alguno de los tratamientos tiene algún efecto promotor o represor sobre la cantidad de terpenos totales. Lo primero que se obtuvo del análisis fue que hubo una interacción significativa entre el efecto del RL y el agregado de MeJA en los terpenos acumulados en los tricomas glandulares tipo VI (Fig. 16A). Se obtuvieron cantidades de terpenos más altas en los tratamientos Amb-C y RL-MeJA, y cantidades menores en los tratamientos Amb-MeJA y RL-C. Esto se podría deber a que en el tratamiento el RL-C los recursos de las plantas se invierten en el SAS, mientras que en el tratamiento Amb-MeJA se favorecerían principalmente las defensas directas de las plantas. Al combinarse ambos factores (RL-MeJA) parecería haber una tendencia a aumentar la cantidad de terpenos almacenados en los tricomas, lo que indicaría que se promueven las defensas indirectas.

Al evaluar la cantidad total de terpenos emitidos (VOCs) no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Fig. 16B). Esto es interesante de considerar, ya que ninguno de los factores estudiados afectó la cantidad total de VOCs. Sin embargo, se detectaron variaciones de las concentraciones de algunos de los terpenos emitidos entre los distintos tratamientos, como en el caso del  $\delta$ -elemeno que aumentó

significativamente su concentración en el tratamiento RL-MeJA (Tabla 5). Esto indica que, si bien los tratamientos no tienen un efecto significativo en la cantidad total de terpenos emitidos, lo que varía son las proporciones de cada terpeno particular en cada tratamiento. A continuación, se discute el efecto del RL y del MeJA sobre la composición de terpenos en las cavidades de los tricomas y *blend* de VOCs.

#### 4. Terpenos acumulados en tricomas y emitidos (VOCs)

Las plantas de *S. habrochaites* LA2167 emiten una gran diversidad de terpenos, tanto monoterpenos como sesquiterpenos, siendo estos últimos la gran mayoría. Esta es una de las principales diferencias que existen con su pariente domesticado, ya que las plantas *S. lycopersicum* emiten en su mayoría monoterpenos (Schilmiller et al., 2009; Zabel et al., 2020). Las distintas accesiones de *S. habrochaites* muestran una alta variabilidad en su composición de terpenos, asociada principalmente a su distribución geográfica (Gonzales-Vigil et al., 2012). Los terpenos identificados en este trabajo coinciden parcialmente con los informados en bibliografía (Fig. 8 y Tabla 4). De los ocho terpenos reportados encontrados en las cavidades de los tricomas por Gonzales-Vigil et al. (2012), cinco terpenos coinciden con los identificados en esta tesis, estos son el  $\delta$ -elemeno, el  $\gamma$ -elemeno, el  $\alpha$ -curcumeno, el zingibereno y el  $\beta$ -elemeno, mientras que no se identificaron tres de ellos, estos son el  $\beta$ -sesquiphellandreno, el  $\beta$ -cariofileno y el  $\alpha$ -cariofileno. Además, en esta tesis se logró identificar y cuantificar un número mayor de terpenos en el tratamiento Amb-C respecto a lo reportado por Gonzales-Vigil et al. (2012) (Tabla 4). Al comparar las proporciones de los cinco terpenos obtenidas en esta tesina con lo reportado en bibliografía, se encontraron algunas diferencias. Según Gonzales-Vigil et al. (2012), se detectó el  $\delta$ -elemeno en un 10.20%, el  $\gamma$ -elemeno en un 8.48%, el  $\alpha$ -curcumeno en un 0.38%, el zingibereno en un 48.0% y el  $\beta$ -elemeno en un 0.39%. En esta tesis, al analizar las concentraciones de dichos terpenos en las cavidades de los tricomas en el tratamiento Amb-C, se detectó el  $\delta$ -elemeno en un 1.46%, el  $\gamma$ -elemeno en un 19.47%, el  $\alpha$ -curcumeno en un 4.67%, el zingibereno en un 67.21% y el  $\beta$ -elemeno en un 1.50% (Fig. 19). Si bien los porcentajes varían, en ambos casos el zingibereno es el terpeno mayormente detectado.

Según Gonzales-Vigil et al. (2012), a partir del análisis de 79 accesiones de *S. habrochaites* se identificaron un total de seis monoterpenos y trece sesquiterpenos. Algunas accesiones de *S. habrochaites* tienen perfiles de terpenos más complejos mientras que otros tienen una composición simple de terpenos dominada por un único compuesto principal, como es el caso de *S. habrochaites* LA1691 que tiene mayoritariamente zingibereno y en menor medida  $\beta$ -sesquiphellandreno y  $\alpha$ -curcumeno (Gonzales-Vigil et al., 2012). Al analizar el perfil de volátiles de *S. habrochaites* LA2167 en esta tesis, se detectaron un total de tres monoterpenos y diez sesquiterpenos, por lo

que se podría determinar que la accesión analizada tiene un perfil de volátiles altamente complejo. Esta diversidad de terpenos que contiene la accesión repercute en el *blend* de VOCs, lo que en definitiva afecta la calidad de la comunicación química de la planta con los organismos del ambiente que la rodean, principalmente insectos herbívoros y predadores/parasitoides.

Al analizar los terpenos acumulados en los tricomas glandulares tipo VI se identificaron únicamente nueve sesquiterpenos (Fig. 18). Esto es interesante ya que, al evaluar los terpenos emitidos por las plantas (VOCs), se detectaron tres monoterpenos y un total de diez sesquiterpenos, es decir un número mayor de compuestos en total (Fig. 21). Esto se puede deber a que se recolectaron únicamente tricomas presentes en la cara adaxial de los folíolos de las hojas, mientras que la recolección de los VOCs es de todo el espacio aéreo de la planta. Existe evidencia que indica que puede haber una síntesis de terpenos diferencial en los tricomas glandulares tipo VI en distintas partes de las plantas, es decir que haya determinados terpenos que no se sinteticen en la cara adaxial de los folíolos y que si se sinteticen en otras, como pueden ser por ejemplo los tricomas glandulares tipo VI de la cara abaxial, del tallo o del pecíolo (Zhou & Pichersky, 2020).

Al emitir las plantas los terpenos en forma de VOCs, el olor final que va a ser detectado está dado por la combinación de los mismos y va a dar lugar a una señal química única que será percibida por el entorno de las plantas (*i.e.* insectos y otras plantas). Es por eso que, si bien el análisis estadístico está realizado individualmente para cada terpeno, es importante considerar que el olor emitido por las plantas va a estar dado por el conjunto de terpenos emitidos y sus respectivas proporciones (*i.e. blend*). Se encuentra reportado que los cambios en el fitocromo B conducen a cambios en la emisión de compuestos volátiles inducibles con MeJA, con posibles consecuencias para las defensas indirectas y para las interacciones tritróficas (interacciones entre las plantas, sus herbívoros y los enemigos naturales de estos herbívoros) (Cortés et al., 2016). En este sentido, hay evidencias previas en *S. lycopersicum* donde se realizaron bioensayos con un depredador de herbívoros de tomate (*Macrolophus basicornis*), utilizando mutantes de fitocromo B (*i.e.* fitocromo inactivo) e inducidas con MeJA. Los resultados mostraron que el insecto prefirió las plantas mutantes de fitocromo B por sobre las *wild type* (phyB activo). Los insectos fueron expuestos también a los volátiles de plantas con el phyB activado y con el phyB inactivado sin inducir con MeJA, pero no mostraron preferencia por ninguna de las fuentes de olor. Estos resultados sugieren que, la inactivación de phyB tiene consecuencias sobre las interacciones tritróficas mediadas por VOCs, presumiblemente atrayendo depredadores a plantas inducidas menos defendidas, donde es probable que encuentren mayor abundancia de presas. Por lo que la inactivación de phyB potencia la expresión de defensas indirectas en plantas inducidas con MeJA (Cortés et al., 2016). Es

de esperar que *S. habrochaites* muestre un comportamiento similar bajo estas condiciones, aunque es necesario llevar a cabo bioensayos para comprobarlo.

Al analizar las concentraciones obtenidas de los terpenos, tanto acumulados en los tricomas como emitidos por las plantas (VOCs), se pudo determinar que no todos los terpenos se comportan de igual manera (Tabla 4 y 5, respectivamente). En el caso de los terpenos acumulados en los tricomas, se obtuvo un valor de interacción (Luz x MeJA) significativo para el  $\beta$ -elemeno, el zingibereno y el valenceno (Tabla 4). Es interesante considerar que para los tres sesquiterpenos se obtuvieron concentraciones más elevadas en el tratamiento Amb-C, seguido por el tratamiento RL-MeJA. Esto coincide con lo obtenido al analizar las cantidades totales de terpenos acumulados en los tricomas glandulares tipo VI, donde obtuvimos cantidades mayores para estos tratamientos (Fig. 16A). Con respecto al tratamiento RL-C, las concentraciones obtenidas son bajas ya que se estaría favoreciendo la respuesta al SAS, por lo que se podrían ver comprometidas las defensas de las plantas (Ballaré, 2014). El efecto combinado del RL y del MeJA para estos terpenos analizados ( $\beta$ -elemeno, zingibereno y valenceno) parecería favorecer sus concentraciones, ya que para los tres casos se obtuvieron concentraciones elevadas. A partir del análisis de las proporciones de los terpenos en cada uno de los tratamientos el zingibereno y el  $\gamma$ -elemeno son los compuestos con mayor proporción en todos ellos (Fig. 19). Esto sugeriría que podrían ser constitutivos, igualmente para el caso del zingibereno la proporción es mayor en los tratamientos con MeJA. Esto es interesante de considerar ya que al comparar las concentraciones del zingibereno entre los tratamientos se obtuvo una concentración menor en los tratamientos RL-MeJA y Amb-MeJA en comparación con el tratamiento Amb-C (Tabla 4). Esto se podría deber a que al activar la vía del JA se reduce el número de terpenos almacenados en las cavidades de los tricomas (de 9 en Amb-C a 7 en Amb-MeJA y a 8 en RL-MeJA) y se favorecen la proporción de aquellos terpenos involucrados en las defensas, como es el caso del zingibereno, y al estar presente en una proporción mayor tendría rol más preponderante en las defensas.

Los tricomas glandulares tipo VI tienen la capacidad de retener altos niveles de VOCs dentro de las cavidades, pero aún se desconocen los mecanismos por los cuales esto se logra, por lo que lo que los terpenos que se almacenan en los tricomas podrían no estar emitiéndose (Tissier et al., 2017). Esto coincide con lo que obtuvimos para el sesquiterpeno tumerona, donde lo detectamos en las cavidades de los tricomas en todos los tratamientos, pero al analizar los VOCs no se detectó en ninguno de los tratamientos (Tabla 4 y 5, respectivamente). A diferencia del análisis de las concentraciones de los terpenos contenidos en los tricomas, los terpenos liberados al espacio aéreo de las plantas son lo que van a ser detectados por los insectos y por las plantas vecinas. Al analizar los terpenos emitidos en forma de VOCs se observa que, al igual que en el caso anterior,

existen terpenos que no varían su concentración de manera significativa entre los tratamientos, mientras que hay otros que si lo hacen (Tabla 5). Existen terpenos que no se detectaron al aplicar el MeJA en relación al tratamiento Amb-C, estos son el *D-limoneno* y el *β-elemeno*, o que redujeron su concentración, como es el caso del *α-pineno*. La concentración emitida de este último monoterpeno se vio favorecida por el tratamiento RL-C, al igual que en el caso del *azuleno* y el *aristoleno*. Existe evidencia que sugiere que la competencia entre plantas puede afectar la emisión de VOCs, por lo que es posible que se utilicen para detectar plantas vecinas en una etapa anterior a la aparición de señales luminosas, aunque los mecanismos involucrados son poco conocidos (Kegge et al., 2013; Kegge & Pierik, 2010). Es interesante destacar que la combinación de los tratamientos RL y MeJA tiene un efecto sobre la concentración del *δ-elemeno*, provocando que su concentración aumente significativamente respecto a los otros tratamientos. Al analizar las proporciones de los terpenos emitidos por las plantas, en el tratamiento Amb-MeJA se favoreció la concentración relativa del *zingibereno*, lo que coincide con el análisis de las concentraciones entre los distintos tratamientos (Fig. 22 y Tabla 5, respectivamente). Esto también coincide con lo obtenido al analizar las proporciones de los terpenos en los tricomas, en donde la proporción también fue mayor en el tratamiento Amb-MeJA (Fig. 19). Esta evidencia sugeriría que el *zingibereno* estaría involucrado en las defensas directas inducibles de las plantas ya que, al aplicar el tratamiento con RL, el mismo tiene efecto negativo sobre la proporción del *zingibereno* y al combinarlo con MeJA (tratamiento RL-MeJA) este efecto no se revierte. En el caso del *γ-elemeno* las proporciones se mantienen en los distintos tratamientos, lo que sugiere que podría estar involucrado en las defensas constitutivas de *S. habrochaites* LA2167. Al igual con lo obtenido al analizar las concentraciones de los terpenos emitidos entre los distintos tratamientos, se obtuvo una proporción mayor del *δ-elemeno* en el tratamiento RL-MeJA (Tabla 5 y Fig. 22, respectivamente). El *δ-elemeno* podría ser un buen candidato de las defensas indirectas inducibles, sin embargo, no hay mucha evidencia en bibliografía que respalde su rol. Por lo tanto, para probar esto habría que considerar el *δ-elemeno* en futuros bioensayos que involucren mezclas de compuestos y atracción de insectos predadores/parasitoides.

## 5. Expresión génica

Al observar que existen diferencias entre los terpenos acumulados en los tricomas glandulares tipo VI y los terpenos emitidos, se prosiguió a evaluar si el efecto del RL y del MeJA se daba a nivel transcripcional. Para esto se realizaron extracciones de RNA de las hojas, con el fin de evaluar si los tratamientos llevaban a una expresión diferencial de determinadas terpeno sintasas. Se seleccionaron las muestras de mejor calidad, con valores de concentración mayores a  $0,2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  y valores de A260/230 y A260/280 cercanos a 2 (Tabla 6). Si bien para algunas muestras los valores obtenidos no fueron

óptimos, se decidió seleccionarlas igual para realizar la retrotranscripción, ya que al evaluar el gel de agarosa se observaron las bandas (Fig. 23). Luego de hacer la retrotranscripción, se analizaron las muestras de cDNA mediante un gel de agarosa y se seleccionaron aquellas de mejor calidad para realizar la q-PCR (Fig. 24). Al realizar la q-PCR, únicamente amplificó el gen de referencia (SGN) en las muestras de las plantas que no se trataron con MeJA (Amb-C y RL-C). Se decidió utilizar al SGN como gen de referencia a partir de bibliografía disponible, en donde se evaluó la estabilidad de expresión de algunos genes en plantas de tomate (*S. lycopersicum*) (Expósito-Rodríguez et al., 2008). A partir de ahí es que se seleccionó a SGN (SGN-U346908) como gen de referencia a utilizar en la q-PCR ya que era uno de los sugeridos. Dicho gen se buscó en la base de datos *Sol Genomics Network* ([https://solgenomics.net/search/unigene.pl?unigene\\_id=SGN-U346908](https://solgenomics.net/search/unigene.pl?unigene_id=SGN-U346908)) y parecería pertenecer a una familia de peptidil-prolil cis-trans isomerasa tipo ciclofilina involucrada en el plegamiento de proteínas. Igualmente, en la bibliografía encontrada no se evaluaron los genes en distintos tratamientos como lo hacemos en nuestro caso (tratamiento con RL y MeJA), es por eso que dicho gen puede funcionar como gen de referencia para el tratamiento de luz, pero puede no funcionar para el tratamiento con la hormona. Podría pasar a que el gen esté interfiriendo en alguna parte de la vía de señalización de la hormona, pero no hay información reportada al respecto. Teniendo en cuenta que el genoma de *S. habrochaites* no está del todo secuenciado, se intentó utilizar *primers* para la actina (Act) diseñados para *S. lycopersicum* como gen de referencia, pero al hacer una PCR no se obtuvo amplificación para ninguna de las muestras. Es por eso que se analizaron únicamente los resultados obtenidos para los tratamientos RL-C y Amb-C utilizando el SGN como gen de referencia.

Se decidió analizar la expresión de los genes que codifican para las enzimas CPT1, zingibereno sintasa (Zis) y valenceno sintasa (TPS17). La enzima CPT1 sintetiza el sustrato NPP (neril-difosfato) que es un precursor de la síntesis de los monoterpenos y los sesquiterpenos (Zhou & Pichersky, 2020). La enzima Zis sintetiza el zingibereno, uno de los terpenos identificados en mayor concentración tanto en las cavidades de los tricomas como en los VOCs (Tabla 4 y 5, respectivamente). El zingibereno parece conferir una gama amplia de resistencia contra diversas plagas, incluidas la polilla del tomate (*Tuta absoluta*), la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), la araña roja (*Tetranychus evansi*) y el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) (Carter et al., 1989; de Azevedo et al., 2003; Freitas et al., 2002; Wilson R Maluf et al., 2001; Wilson Roberto Maluf et al., 2010). Los bioensayos de actividades antibacterianas, fungicidas e insecticidas mostraron que el zingibereno exhibe una variedad de actividades biológicas, lo que respalda su papel en la defensa de las plantas de tomate contra diversas plagas (Zabel et al., 2020). Recientemente, se demostró que TPS17 codifica una valenceno

sintasa que sintetiza el sesquiterpeno *valenceno* (Bleeker et al., 2011). En esta tesis, dicho terpeno se encontró en concentraciones menores en comparación con el *zingibereno* (Tabla 4 y 5).

Los análisis demostraron que la expresión relativa de CPT1 no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos Amb-C y RL-C, por lo que el tratamiento con RL parecería no estar reprimiendo la expresión de esta enzima clave en la vía de síntesis de los terpenos (Fig. 25B). En el caso del *zingibereno*, al querer evaluar los niveles de expresión de la enzima que lo sintetiza (Zis), no se pudo realizar un análisis estadístico debido a que en el tratamiento RL-C únicamente amplificó una muestra (Fig. 26). Al analizar el sesquiterpeno *valenceno*, se detectó únicamente en las cavidades de los tricomas glandulares tipo VI de los tratamientos Amb-Control y RL-MeJA, pero al analizar los VOCs emitidos se detectó en todos los tratamientos (Tabla 4 y 5, respectivamente). Al evaluar la expresión de la TPS17 no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que no hubo un efecto significativo del tratamiento con RL en la expresión de los genes que analizamos (Fig. 27). En resumen, la inactivación del fitocromo B no tuvo un efecto significativo a nivel transcripcional sobre las enzimas CPT1 y TPS17.

En este trabajo de tesina se presentan resultados que contribuyen a la comprensión de los cambios en la composición y emisión de los terpenos, y la variación en los niveles de expresión génica en las plantas de *S. habrochaites* en condiciones de competencia por luz y estrés por herbivoría. Se identificaron algunos terpenos cuyas concentraciones se vieron favorecidas al combinar ambos tratamientos, dichos terpenos podrían participar en la atracción de insectos predadores/parasitoides de los herbívoros frecuentes de *S. habrochaites*. Al analizar si el efecto del RL se daba a nivel transcripcional, no se observaron efectos significativos por el tratamiento con luz RL en los niveles de expresión de las enzimas seleccionadas que participan en las síntesis de los terpenos. Es necesario avanzar en entender los mecanismos mediante los cuales el RL estaría afectando la composición y emisión de terpenos. Asimismo, es necesario realizar bioensayos con diferentes composiciones de terpenos para entender las interacciones tritróficas que tienen las especies silvestres del género *Solanum*.

## Conclusiones

- La inactivación del fitocromo B (baja relación de R:RL) desencadenó las respuestas de SAS independientemente de la activación de la vía del JA por la aplicación de MeJA.
- Al realizar un tratamiento prolongado, el efecto de la aplicación del MeJA predominó frente al tratamiento de luz (baja relación de R:RL) promoviendo un aumento en la densidad de tricomas glandulares tipo VI, pero igualmente se evidenció una tendencia del RL a contrarrestar dicho efecto.
- Hubo un efecto de la baja relación R:RL sobre la inducción de las respuestas de defensa mediadas por JA sobre la identidad y la concentración de los terpenos acumulados y emitidos.
- El  $\alpha$ -pineno, azuleno y el aristoleno podrían ser candidatos responsables de generar una señal química similar a la de *shade avoidance* para plantas que aún no detectaron los cambios en el ambiente lumínico (baja relación de R:RL).
- Dado que el  $\delta$ -elemeno se detectó en una mayor proporción en el tratamiento RL-MeJA, podría estar involucrado en las defensas inducibles indirectas de *S. habrochaites* LA2167. Por su parte el zingibereno, al estar presente en una mayor proporción en el tratamiento Amb-MeJA, podría estar involucrado en las defensas inducibles directas; mientras que el  $\gamma$ -elemeno, al mantener su proporción en los distintos tratamientos, podría ser parte de las defensas constitutivas de *S. habrochaites* LA2167.
- La inactivación del fitocromo B (baja relación de R:RL) no tuvo un efecto significativo a nivel transcripcional sobre las enzimas CPT1 y TPS17. Sería necesario probar otros genes de referencia para poder investigar el rol del fitocromo B combinado con el efecto del MeJA sobre los niveles de expresión de estas enzimas.



## Referencias bibliográficas

- Alba, J. M., Montserrat, M., & Fernández-Muñoz, R. (2009). Resistance to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) by acylsucroses of wild tomato (*Solanum pimpinellifolium*) trichomes studied in a recombinant inbred line population. *Experimental & Applied Acarology*, *47*(1), 35–47. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9192-4>
- Antonious, G. F., Kochhar, T. S., & Simmons, A. M. (2005). Natural products: seasonal variation in trichome counts and contents in *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *40*(4), 619–631. <https://doi.org/10.1081/PFC-200061567>
- Antonious, G. F., & Snyder, J. C. (2006). Natural products: repellency and toxicity of wild tomato leaf extracts to the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *41*(1), 43–55. <https://doi.org/10.1080/03601230500234893>
- Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, *100*(5), 1085–1094. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm150>
- Balcke, G. U., Bennewitz, S., Bergau, N., Athmer, B., Henning, A., Majovsky, P., Jiménez-Gómez, J. M., Hoehenwarter, W., & Tissier, A. (2017). Multi-Omics of Tomato Glandular Trichomes Reveals Distinct Features of Central Carbon Metabolism Supporting High Productivity of Specialized Metabolites. *The Plant Cell*, *29*(5), 960–983. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00060>
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C. C., & Preston, C. A. (2006). Volatile signaling in plant-plant interactions: “Talking trees” in the genomics era. *Science*, *311*(5762), 812–815. <https://doi.org/10.1126/science.1118446>
- Ballaré, C. L. (2014). Light regulation of plant defense. *Annual Review of Plant Biology*, *65*(January), 335–363. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040145>
- Ballaré, C. L. (2017). Phytochrome Responses: Think Globally, Act Locally. *Trends in Plant Science*, *22*(11), 909–911. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.004>
- Ballaré, C. L., & Pierik, R. (2017). The shade-avoidance syndrome: Multiple signals and ecological consequences. *Plant Cell and Environment*, *40*(11), 2530–2543. <https://doi.org/10.1111/pce.12914>
- BALLARÉ, C. L., SÁNCHEZ, R. A., SCOPEL, A. L., CASAL, J. J., & GHERSA, C. M. (1987). Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight. *Plant, Cell & Environment*, *10*(7), 551–557. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11604091>
- Ballaré, C. L., Scopel, A. L., & Sánchez, R. A. (1990). Far-red radiation reflected from adjacent leaves: An early signal of competition in plant canopies. *Science*, *247*(4940), 329–332. <https://doi.org/10.1126/science.247.4940.329>
- Baur, R., Binder, S., & Benz, G. (1991). Nonglandular leaf trichomes as short-term inducible defense of the grey alder, *Alnus incana* (L.), against the chrysomelid beetle, *Agelastica alni* L. *Oecologia*, *87*(2), 219–226. <https://doi.org/10.1007/BF00325259>
- Bergau, N., Bennewitz, S., Syrowatka, F., Hause, G., & Tissier, A. (2015). The development of type VI glandular trichomes in the cultivated tomato *Solanum lycopersicum* and a related wild species *S. habrochaites*. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0678-z>
- Besser, K., Harper, A., Welsby, N., Schauvinhold, I., Slocombe, S., Li, Y., Dixon, R. A., & Broun,

- P. (2009). Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. *Plant Physiology*, *149*(1), 499–514. <https://doi.org/10.1104/pp.108.126276>
- Bleeker, P. M., Diergaarde, P. J., Ament, K., Guerra, J., Weidner, M., Schütz, S., de Both, M. T. J., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2009). The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. *Plant Physiology*, *151*(2), 925–935. <https://doi.org/10.1104/pp.109.142661>
- Bleeker, P. M., Spyropoulou, E. A., Diergaarde, P. J., Volpin, H., De Both, M. T. J., Zerbe, P., Bohlmann, J., Falara, V., Matsuba, Y., Pichersky, E., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2011). RNA-seq discovery, functional characterization, and comparison of sesquiterpene synthases from *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites* trichomes. *Plant Molecular Biology*, *77*(4–5), 323–336. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9813-x>
- Boughton, A. J., Hoover, K., & Felton, G. W. (2005). Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Chemical Ecology*, *31*(9), 2211–2216. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-6228-7>
- Carter, C. D., Sacalis, J. N., & Gianfagna, T. J. (1989). Zingiberene and resistance to Colorado potato beetle in *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *37*(1), 206–210. <https://doi.org/10.1021/jf00085a047>
- Casal, J. J. (2012). Shade Avoidance. *The Arabidopsis Book*, *10*, e0157. <https://doi.org/10.1199/tab.0157>
- Cipollini, D. (2004). Stretching the limits of plasticity: Can a plant defend against both competitors and herbivores? *Ecology*, *85*(1), 28–37. <https://doi.org/10.1890/02-0615>
- Cortés, L. E., Weldegergis, B. T., Boccalandro, H. E., Dicke, M., & Ballaré, C. L. (2016). Trading direct for indirect defense? Phytochrome B inactivation in tomato attenuates direct anti-herbivore defenses whilst enhancing volatile-mediated attraction of predators. *New Phytologist*, *212*(4), 1057–1071. <https://doi.org/10.1111/nph.14210>
- D'Alessandro, M., & Turlings, T. C. J. (2005). In situ modification of herbivore-induced plant odors: a novel approach to study the attractiveness of volatile organic compounds to parasitic wasps. *Chemical Senses*, *30*(9), 739–753. <https://doi.org/10.1093/chemse/bji066>
- de Azevedo, S. M., Ventura Faria, M., Maluf, W. R., Barneche de Oliveira, A. C., & de Freitas, J. A. (2003). Zingiberene-mediated resistance to the South American tomato pinworm derived from *Lycopersicon hirsutum* var. *hirsutum*. *Euphytica*, *134*(3), 347–351. <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000005007.14924.d2>
- de Wit, M., Spoel, S. H., Sanchez-Perez, G. F., Gommers, C. M. M., Pieterse, C. M. J., Voesenek, L. A. C. J., & Pierik, R. (2013). Perception of low red:far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in *Arabidopsis*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *75*(1), 90–103. <https://doi.org/10.1111/tpj.12203>
- Degenhardt, J., Köllner, T. G., & Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, *70*(15–16), 1621–1637. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030>
- Dicke, M., & Baldwin, I. T. (2010). The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the “cry for help”. *Trends in Plant Science*, *15*(3), 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.002>
- Dicke, M., & Loreto, F. (2010). Induced plant volatiles: from genes to climate change. In *Trends in plant science* (Vol. 15, Issue 3, pp. 115–117). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.007>

- Dicke, M., van Poecke, R. M. P., & de Boer, J. G. (2003). Inducible indirect defence of plants: from mechanisms to ecological functions. *Basic and Applied Ecology*, 4(1), 27–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1078/1439-1791-00131>
- Doebley, J. F., Gaut, B. S., & Smith, B. D. (2006). The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 127(7), 1309–1321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.006>
- Dong, F., Fu, X., Watanabe, N., Su, X., & Yang, Z. (2016). Recent Advances in the Emission and Functions of Plant Vegetative Volatiles. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(2), 124. <https://doi.org/10.3390/molecules21020124>
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1), 16–32. <https://doi.org/10.1111/nph.12145>
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I. (2006). Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(5), 417–440. <https://doi.org/10.1080/07352680600899973>
- Ehleringer, J. R. (1984). *Ecology and Ecophysiology of Leaf Pubescence in North American Desert Plants*.
- Erb, M., Lenk, C., Degenhardt, J., & Turlings, T. C. J. (2009). The underestimated role of roots in defense against leaf attackers. *Trends in Plant Science*, 14(12), 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.006>
- Expósito-Rodríguez, M., Borges, A. A., Borges-Pérez, A., & Pérez, J. A. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-131>
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.-M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J. M., Pauwels, L., Witters, E., Puga, M. I., Paz-Ares, J., Goossens, A., Reymond, P., De Jaeger, G., & Solano, R. (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant Cell*, 23(2), 701–715. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080788>
- Fernández-Milmanda, G. L., Crocco, C. D., Reichelt, M., Mazza, C. A., Köllner, T. G., Zhang, T., Cargnel, M. D., Lichy, M. Z., Fiorucci, A.-S., Fankhauser, C., Koo, A. J., Austin, A. T., Gershenzon, J., & Ballaré, C. L. (2020). A light-dependent molecular link between competition cues and defence responses in plants. *Nature Plants*, 6(3), 223–230. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0604-8>
- Ferrero, V., Baeten, L., Blanco-Sánchez, L., Planelló, R., Díaz-Pendón, J. A., Rodríguez-Echeverría, S., Haegeman, A., & de la Peña, E. (2020). Complex patterns in tolerance and resistance to pests and diseases underpin the domestication of tomato. *New Phytologist*, 226(1), 254–266. <https://doi.org/10.1111/nph.16353>
- Freitas, J. A., Maluf, W. R., das Graças Cardoso, M., Gomes, L. A. A., & Bearzotti, E. (2002). Inheritance of foliar zingiberene contents and their relationship to trichome densities and whitefly resistance in tomatoes. *Euphytica*, 127(2), 275–287. <https://doi.org/10.1023/A:1020239512598>
- Gonzales-Vigil, E., Hufnagel, D. E., Kim, J., Last, R. L., & Barry, C. S. (2012). Evolution of TPS20-related terpene synthases influences chemical diversity in the glandular trichomes of the wild tomato relative *Solanum habrochaites*. *Plant Journal*, 71(6), 921–935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05040.x>
- Halitschke, R., Keßler, A., Kahl, J., Lorenz, A., & Baldwin, I. T. (2000). Ecophysiological comparison of direct and indirect defenses in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia*, 124(3), 408–

417. <https://doi.org/10.1007/s004420000389>
- Hartman, J., & Clair, D. (2008). Variation for aphid resistance and insecticidal acyl sugar expression among and within *Lycopersicon pennellii*-derived inbred backcross lines of tomato and their F1 progeny. *Plant Breeding*, *118*, 531–536. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.1999.00435.x>
- Heil, M. (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, *178*(1), 41–61. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02330.x>
- Heil, M., & Karban, R. (2010). Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends in Ecology & Evolution*, *25*(3), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.09.010>
- Heil, M., & Silva Bueno, J. C. (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(13), 5467–5472. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610266104>
- Hou, X., Lee, L. Y. C., Xia, K., Yan, Y., & Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Developmental Cell*, *19*(6), 884–894. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.024>
- Jeong, J., & Choi, G. (2013). Phytochrome-interacting factors have both shared and distinct biological roles. *Molecules and Cells*, *35*(5), 371–380. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0135-5>
- Johnson, H. B. (1975). Plant pubescence: An ecological perspective. *The Botanical Review*, *41*(3), 233–258. <https://doi.org/10.1007/BF02860838>
- Karabourniotis, G., Kofidis, G., Fasseas, C., Liakoura, V., & Drossopoulos, I. (1998). Polyphenol deposition in leaf hairs of *Olea europaea* (Oleaceae) and *Quercus ilex* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, *85*(7), 1007.
- Karabourniotis, George, Kotsabassidis, D., & Manetas, Y. (1995). Trichome density and its protective potential against ultraviolet-B radiation damage during leaf development. *Canadian Journal of Botany*, *73*(3), 376–383. <https://doi.org/10.1139/b95-039>
- Karban, R., Wetzal, W. C., Shiojiri, K., Ishizaki, S., Ramirez, S. R., & Blande, J. D. (2014). Deciphering the language of plant communication: volatile chemotypes of sagebrush. *The New Phytologist*, *204*(2), 380–385. <https://doi.org/10.1111/nph.12887>
- Kegge, W., & Pierik, R. (2010). Biogenic volatile organic compounds and plant competition. *Trends in Plant Science*, *15*(3), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.007>
- Kegge, W., Weldegergis, B. T., Soler, R., Eijk, M. V. Van, Dicke, M., Voesenek, L. A. C. J., & Pierik, R. (2013). Canopy light cues affect emission of constitutive and methyl jasmonate-induced volatile organic compounds in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, *200*(3), 861–874. <https://doi.org/10.1111/nph.12407>
- Khush, G. S. (2001). Green revolution: the way forward. *Nature Reviews. Genetics*, *2*(10), 815–822. <https://doi.org/10.1038/35093585>
- Kumar, S., Bhanjana, G., Sharma, A., Sidhu, M. C., & Dilbaghi, N. (2014). Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, *101*, 1061–1067. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.025>
- Lawson, D. M., Lunde, C. F., & Mutschler, M. A. (1997). Marker-assisted transfer of acylsugar-mediated pest resistance from the wild tomato, *Lycopersicon pennellii*, to the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Molecular Breeding*, *3*(4), 307–317.

<https://doi.org/10.1023/A:1009677412902>

- Leivar, P., & Quail, P. H. (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science*, *16*(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.003>
- Leone, M., Keller, M. M., Cerrudo, I., & Ballaré, C. L. (2014). To grow or defend? Low red: Far-red ratios reduce jasmonate sensitivity in Arabidopsis seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ10 stability. *New Phytologist*, *204*(2), 355–367. <https://doi.org/10.1111/nph.12971>
- Levin, D. A. (1973). The Role of Trichomes in Plant Defense. *The Quarterly Review of Biology*, *48*(1), 3–15. <http://www.jstor.org/stable/2822621>
- Li, X., Garvey, M., Kaplan, I., Li, B., & Carrillo, J. (2018). Domestication of tomato has reduced the attraction of herbivore natural enemies to pest-damaged plants. *Agricultural and Forest Entomology*, *20*(3), 390–401. <https://doi.org/10.1111/afe.12271>
- Loughrin, J. H., Manukian, A., Heath, R. R., & Tumlinson, J. H. (1995). Volatiles emitted by different cotton varieties damaged by feeding beet armyworm larvae. *Journal of Chemical Ecology*, *21*(8), 1217–1227. <https://doi.org/10.1007/BF02228321>
- Lucatti, A. F. E. A. A. ; cristina r Ma. elsA G. (2010). Resistance of Tomato Genotypes to the Greenhouse Whitefly Trialeurodes.pdf. *Neotropical Entomology*, *39*(5), 792–798. <http://www.scielo.br/pdf/ne/v39n5/19.pdf>
- Maluf, Wilson R, Campos, G. A., & das Graças Cardoso, M. (2001). Relationships between trichome types and spider mite (*Tetranychus evansi*) repellence in tomatoes with respect to foliar zingiberene contents. *Euphytica*, *121*(1), 73–80. <https://doi.org/10.1023/A:1012067505361>
- Maluf, Wilson Roberto, de Fátima Silva, V., das Graças Cardoso, M., Gomes, L. A. A., Neto, Á. C. G., Maciel, G. M., & Nízio, D. A. C. (2010). Resistance to the South American tomato pinworm *Tuta absoluta* in high acylsugar and/or high zingiberene tomato genotypes. *Euphytica*, *176*(1), 113–123. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0234-8>
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, *63*, 431–450. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854>
- Nagel, J., Culley, L. K., Lu, Y., Liu, E., Matthews, P. D., Stevens, J. F., & Page, J. E. (2008). EST Analysis of Hop Glandular Trichomes Identifies an O-Methyltransferase That Catalyzes the Biosynthesis of Xanthohumol. *The Plant Cell*, *20*(1), 186–200. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055178>
- Olsson, M. E., Olofsson, L. M., Lindahl, A.-L., Lundgren, A., Brodelius, M., & Brodelius, P. E. (2009). Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. *Phytochemistry*, *70*(9), 1123–1128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.009>
- Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science (New York, N.Y.)*, *311*(5762), 808–811. <https://doi.org/10.1126/science.1118510>
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., & Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, *23*(5), 1795–1814. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083261>
- Quinet, M., Angosto, T., Yuste-Lisbona, F. J., Blanchard-Gros, R., Bigot, S., Martinez, J.-P., &

- Lutts, S. (2019). Tomato Fruit Development and Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1554. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01554>
- Rodriguez-Saona, C. R., & Frost, C. J. (2010). New evidence for a multi-functional role of herbivore-induced plant volatiles in defense against herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, *5*(1), 58–60. <https://doi.org/10.4161/psb.5.1.10160>
- Sallaud, C., Rontein, D., Onillon, S., Jabès, F., Duffé, P., Giacalone, C., Thoraval, S., Escoffier, C., Herbette, G., Leonhardt, N., Causse, M., & Tissier, A. (2009). A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *The Plant Cell*, *21*(1), 301–317. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057885>
- Sasidharan, R., Chinnappa, C. C., Staal, M., Elzenga, J. T. M., Yokoyama, R., Nishitani, K., Voesenek, L. A. C. J., & Pierik, R. (2010). Light quality-mediated petiole elongation in arabidopsis during shade avoidance involves cell wall modification by xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases. *Plant Physiology*, *154*(2), 978–990. <https://doi.org/10.1104/pp.110.162057>
- Schillmiller, A. L., Schauvinhold, I., Larson, M., Xu, R., Charbonneau, A. L., Schmidt, A., Wilkerson, C., Last, R. L., & Pichersky, E. (2009). Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(26), 10865–10870. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904113106>
- Schoonhoven, L., van Loon, J., & Dicke, M. (2005). *Insect-Plant Biology*.
- Sifres, A., Blanca, J., & Nuez, F. (2011). Pattern of genetic variability of *Solanum habrochaites* in its natural area of distribution. *Genet. Resour. Crop Evol*, *58*, 347–360. <https://doi.org/10.1007/s10722-010-9578-0>
- Sirikantaramas, S., Taura, F., Tanaka, Y., Ishikawa, Y., Morimoto, S., & Shoyama, Y. (2005). Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant & Cell Physiology*, *46*(9), 1578–1582. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci166>
- Smith, H. (1995). Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *46*, 289–315. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.46.060195.001445>
- Tissier, A., Morgan, J. A., & Dudareva, N. (2017). Plant Volatiles: Going ‘In’ but not ‘Out’ of Trichome Cavities. *Trends in Plant Science*, *22*(11), 930–938. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.001>
- Turlings, T. C., Tumlinson, J. H., & Lewis, W. J. (1990). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science (New York, N.Y.)*, *250*(4985), 1251–1253. <https://doi.org/10.1126/science.250.4985.1251>
- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E. E., Froehlich, J. E., & Croteau, R. (1999). Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology*, *120*(3), 879–886. <https://doi.org/10.1104/pp.120.3.879>
- Turner, G. W., Gershenzon, J., & Croteau, R. B. (2000). Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiology*, *124*(2), 655–664. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.655>
- Unsicker, S. B., Kunert, G., & Gershenzon, J. (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(4), 479–485. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.001>

- Van Eck, J., Kirk, D. D., & Walmsley, A. M. (2006). Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 343, 459–473. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:459>
- Wang, F., Park, Y. L., & Gutensohn, M. (2020). Glandular trichome-derived sesquiterpenes of wild tomato accessions (*Solanum habrochaites*) affect aphid performance and feeding behavior. *Phytochemistry*, 180(December 2019), 112532. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112532>
- Wang, G., Tian, L., Aziz, N., Broun, P., Dai, X., He, J., King, A., Zhao, P. X., & Dixon, R. A. (2008). Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. *Plant Physiology*, 148(3), 1254–1266. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125187>
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1306–1320. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>
- Werker, E. (2000). Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research - ADVAN BOTAN RES*, 31, 1–35. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(00\)31005-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(00)31005-9)
- Whitehead, S. R., Turcotte, M. M., & Poveda, K. (2017). Domestication impacts on plant-herbivore interactions: a meta-analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 372(1712), 20160034. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0034>
- Xie, Z., Kapteyn, J., & Gang, D. R. (2008). A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 54(3), 349–361. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03429.x>
- Xu, J., Van Herwijnen, Z. O., Dräger, D. B., Sui, C., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2018). SIMYC1 regulates type VI glandular trichome formation and terpene biosynthesis in tomato glandular cells. *Plant Cell*, 30(12), 2988–3005. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00571>
- Yactayo-chang, J. P., Tang, H. V., Mendoza, J., Christensen, S. A., & Block, A. K. (2020). *Plant Defense Chemicals against Insect Pests*.
- Yang, C., Marillonnet, S., & Tissier, A. (2021). The scarecrow-like transcription factor SISCL3 regulates volatile terpene biosynthesis and glandular trichome size in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Journal*, 107(4), 1102–1118. <https://doi.org/10.1111/tpj.15371>
- Zabel, S., Brandt, W., Porzel, A., Athmer, B., Kortbeek, R., Bleeker, P., & Tissier, A. (2020). *Two novel 7-epi-zingiberene derivatives with biological activity from Solanum habrochaites are produced by a single cytochrome P450 monooxygenase*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.21.052571>
- Zhou, F., & Pichersky, E. (2020). The complete functional characterisation of the terpene synthase family in tomato. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.16431>
- Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., A, M., Jiang, Z., Kim, J.-M., To, T. K., Li, W., Zhang, X., Yu, Q., Dong, Z., Chen, W.-Q., Seki, M., Zhou, J.-M., & Guo, H. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(30), 12539–12544. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103959108>

## Anexo I: Acumulación de terpenos en tricomas glandulares tipo VI en cada tratamiento

### a. Tratamiento Amb-C

```
> anova(fit.terpeno)
```

```
Analysis of Variance Table
```

```
Response: sqrt(Concentracion_AmbC)
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Terpeno   8 144.006  18.0008   10.203 5.362e-05 ***
Residuals 16  28.228   1.7643
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
$contrasts
```

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
alfaCurcumeno - Aloaromadendreno	1.0049	1.21	16	0.829	0.9940
alfaCurcumeno - betaElemeno	0.8553	1.21	16	0.705	0.9980
alfaCurcumeno - betaFarneseno	1.1545	1.53	16	0.753	0.9968
alfaCurcumeno - deltaElemeno	0.8808	1.08	16	0.812	0.9947
alfaCurcumeno - gamaElemeno	-1.7317	0.97	16	-1.785	0.6905
alfaCurcumeno - Tumerona	0.3638	1.21	16	0.300	1.0000
alfaCurcumeno - Valenceno	1.2111	1.21	16	0.999	0.9805
alfaCurcumeno - Zingibereno	-5.3510	0.97	16	-5.516	0.0012
Aloaromadendreno - betaElemeno	-0.1496	1.33	16	-0.113	1.0000
Aloaromadendreno - betaFarneseno	0.1496	1.63	16	0.092	1.0000
Aloaromadendreno - deltaElemeno	-0.1241	1.21	16	-0.102	1.0000
Aloaromadendreno - gamaElemeno	-2.7365	1.11	16	-2.462	0.3168
Aloaromadendreno - Tumerona	-0.6411	1.33	16	-0.483	0.9999
Aloaromadendreno - Valenceno	0.2062	1.33	16	0.155	1.0000
Aloaromadendreno - Zingibereno	-6.3559	1.11	16	-5.719	0.0008
betaElemeno - betaFarneseno	0.2992	1.63	16	0.184	1.0000
betaElemeno - deltaElemeno	0.0255	1.21	16	0.021	1.0000
betaElemeno - gamaElemeno	-2.5870	1.11	16	-2.328	0.3812
betaElemeno - Tumerona	-0.4915	1.33	16	-0.370	1.0000
betaElemeno - Valenceno	0.3558	1.33	16	0.268	1.0000
betaElemeno - Zingibereno	-6.2063	1.11	16	-5.585	0.0010
betaFarneseno - deltaElemeno	-0.2737	1.53	16	-0.178	1.0000
betaFarneseno - gamaElemeno	-2.8862	1.46	16	-1.984	0.5734
betaFarneseno - Tumerona	-0.7907	1.63	16	-0.486	0.9999
betaFarneseno - Valenceno	0.0566	1.63	16	0.035	1.0000
betaFarneseno - Zingibereno	-6.5055	1.46	16	-4.471	0.0087
deltaElemeno - gamaElemeno	-2.6124	0.97	16	-2.693	0.2244
deltaElemeno - Tumerona	-0.5170	1.21	16	-0.426	0.9999
deltaElemeno - Valenceno	0.3303	1.21	16	0.272	1.0000
deltaElemeno - Zingibereno	-6.2318	0.97	16	-6.424	0.0002
gamaElemeno - Tumerona	2.0955	1.11	16	1.886	0.6316
gamaElemeno - Valenceno	2.9428	1.11	16	2.648	0.2407
gamaElemeno - Zingibereno	-3.6194	0.84	16	-4.308	0.0119
Tumerona - Valenceno	0.8473	1.33	16	0.638	0.9990
Tumerona - Zingibereno	-5.7148	1.11	16	-5.142	0.0024
Valenceno - Zingibereno	-6.5621	1.11	16	-5.905	0.0006

**Figura S1.** Análisis de la varianza y contrastes para los terpenos en las cavidades de los tricomas glandulares tipo VI de plantas de *S. habrochaites* LA2167. Las plantas fueron tratadas con una solución control sin MeJA (Control) en condiciones de luz blanca (Amb).

### b. Tratamiento Amb-MeJA



```
> anova(fit.terpeno)
Analysis of Variance Table

Response: sqrt(Concentracion_AmbMeJA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Terpeno   6 67.996 11.3327  10.674 7.758e-05 ***
Residuals 16 16.987  1.0617
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
$contrasts
      contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
alfaCurcumeno - Aloaromadendreno    0.5067 0.941 16   0.539 0.9977
alfaCurcumeno - betaFarneseno     0.2886 0.841 16   0.343 0.9998
alfaCurcumeno - deltaElemeno      0.2509 0.841 16   0.298 0.9999
alfaCurcumeno - gamaElemeno     -0.9575 0.752 16  -1.272 0.8545
alfaCurcumeno - Tumerona        -0.4521 0.941 16  -0.481 0.9988
alfaCurcumeno - Zingibereno     -4.1688 0.752 16  -5.540 0.0007 ←
Aloaromadendreno - betaFarneseno  -0.2181 0.941 16  -0.232 1.0000
Aloaromadendreno - deltaElemeno  -0.2558 0.941 16  -0.272 1.0000
Aloaromadendreno - gamaElemeno   -1.4642 0.862 16  -1.698 0.6264
Aloaromadendreno - Tumerona     -0.9588 1.030 16  -0.931 0.9617
Aloaromadendreno - Zingibereno  -4.6755 0.862 16  -5.424 0.0009 ←
betaFarneseno - deltaElemeno     -0.0376 0.841 16  -0.045 1.0000
betaFarneseno - gamaElemeno     -1.2461 0.752 16  -1.656 0.6516
betaFarneseno - Tumerona        -0.7407 0.941 16  -0.787 0.9830
betaFarneseno - Zingibereno     -4.4574 0.752 16  -5.924 0.0003 ←
deltaElemeno - gamaElemeno      -1.2084 0.752 16  -1.606 0.6809
deltaElemeno - Tumerona        -0.7031 0.941 16  -0.747 0.9869
deltaElemeno - Zingibereno     -4.4197 0.752 16  -5.874 0.0004 ←
gamaElemeno - Tumerona          0.5054 0.862 16   0.586 0.9964
gamaElemeno - Zingibereno      -3.2113 0.652 16  -4.928 0.0023 ←
Tumerona - Zingibereno         -3.7167 0.862 16  -4.311 0.0078 ←
```

**Figura S2.** Análisis de la varianza y contrastes para los terpenos en las cavidades de los tricomas glandulares tipo VI de plantas de *S. habrochaites* LA2167. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450  $\mu$ M) en condiciones de luz blanca (Amb).

### c. Tratamiento RL-C

```
> anova(fit.terpeno)
Analysis of Variance Table

Response: sqrt(Concentracion_AmbMeJA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Terpeno   6 67.996 11.3327  10.674 7.758e-05 ***
Residuals 16 16.987  1.0617
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```

$contrasts
contrast estimate SE df t.ratio p.value
alfaCurcumeno - Aloaromadendreno 0.5067 0.941 16 0.539 0.9977
alfaCurcumeno - betaFarneseno 0.2886 0.841 16 0.343 0.9998
alfaCurcumeno - deltaElemeno 0.2509 0.841 16 0.298 0.9999
alfaCurcumeno - gamaElemeno -0.9575 0.752 16 -1.272 0.8545
alfaCurcumeno - Tumerona -0.4521 0.941 16 -0.481 0.9988
alfaCurcumeno - Zingibereno -4.1688 0.752 16 -5.540 0.0007 ←
Aloaromadendreno - betaFarneseno -0.2181 0.941 16 -0.232 1.0000
Aloaromadendreno - deltaElemeno -0.2558 0.941 16 -0.272 1.0000
Aloaromadendreno - gamaElemeno -1.4642 0.862 16 -1.698 0.6264
Aloaromadendreno - Tumerona -0.9588 1.030 16 -0.931 0.9617
Aloaromadendreno - Zingibereno -4.6755 0.862 16 -5.424 0.0009 ←
betaFarneseno - deltaElemeno -0.0376 0.841 16 -0.045 1.0000
betaFarneseno - gamaElemeno -1.2461 0.752 16 -1.656 0.6516
betaFarneseno - Tumerona -0.7407 0.941 16 -0.787 0.9830
betaFarneseno - Zingibereno -4.4574 0.752 16 -5.924 0.0003 ←
deltaElemeno - gamaElemeno -1.2084 0.752 16 -1.606 0.6809
deltaElemeno - Tumerona -0.7031 0.941 16 -0.747 0.9869
deltaElemeno - Zingibereno -4.4197 0.752 16 -5.874 0.0004 ←
gamaElemeno - Tumerona 0.5054 0.862 16 0.586 0.9964
gamaElemeno - Zingibereno -3.2113 0.652 16 -4.928 0.0023 ←
Tumerona - Zingibereno -3.7167 0.862 16 -4.311 0.0078 ←

```

**Figura S3.** Análisis de la varianza y contrastes para los terpenos en las cavidades de los tricomas glandulares tipo VI de plantas de *S. habrochaites* LA2167. Las plantas fueron tratadas con una solución control sin MeJA (Control) en condiciones de luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL).

#### d. Tratamiento RL-MeJA

```

> anova(fit.terpeno)
Analysis of Variance Table

Response: sqrt(Concentracion_RLMeJA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Terpeno  7 96.706 13.8151  12.094 3.702e-05 ***
Residuals 15 17.135  1.1423
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

\$contrasts						
contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value	
alfacurcumeno - betaelemeno	0.4911	0.894	15	0.549	0.9990	
alfacurcumeno - betafarneseno	0.4345	1.171	15	0.371	0.9999	
alfacurcumeno - deltaelemeno	0.4127	0.781	15	0.529	0.9993	
alfacurcumeno - gamaelemeno	-1.5212	0.717	15	-2.122	0.4444	
alfacurcumeno - Tumerona	-0.1143	0.894	15	-0.128	1.0000	
alfacurcumeno - valenceno	0.6189	1.171	15	0.529	0.9993	
alfacurcumeno - zingibereno	-4.8670	0.676	15	-7.200	0.0001	←
betaelemeno - betafarneseno	-0.0565	1.309	15	-0.043	1.0000	
betaelemeno - deltaelemeno	-0.0784	0.976	15	-0.080	1.0000	
betaelemeno - gamaelemeno	-2.0122	0.926	15	-2.174	0.4165	
betaelemeno - Tumerona	-0.6054	1.069	15	-0.566	0.9988	
betaelemeno - valenceno	0.1278	1.309	15	0.098	1.0000	
betaelemeno - zingibereno	-5.3581	0.894	15	-5.992	0.0005	←
betafarneseno - deltaelemeno	-0.0219	1.234	15	-0.018	1.0000	
betafarneseno - gamaelemeno	-1.9557	1.195	15	-1.637	0.7236	
betafarneseno - Tumerona	-0.5489	1.309	15	-0.419	0.9998	
betafarneseno - valenceno	0.1843	1.511	15	0.122	1.0000	
betafarneseno - zingibereno	-5.3016	1.171	15	-4.528	0.0073	←
deltaelemeno - gamaelemeno	-1.9338	0.816	15	-2.369	0.3213	
deltaelemeno - Tumerona	-0.5270	0.976	15	-0.540	0.9991	
deltaelemeno - valenceno	0.2062	1.234	15	0.167	1.0000	
deltaelemeno - zingibereno	-5.2797	0.781	15	-6.764	0.0001	
gamaelemeno - Tumerona	1.4068	0.926	15	1.520	0.7863	
gamaelemeno - valenceno	2.1400	1.195	15	1.791	0.6347	
gamaelemeno - zingibereno	-3.3459	0.717	15	-4.667	0.0056	←
Tumerona - valenceno	0.7332	1.309	15	0.560	0.9989	
Tumerona - zingibereno	-4.7527	0.894	15	-5.315	0.0017	←
valenceno - zingibereno	-5.4859	1.171	15	-4.686	0.0054	←

**Figura S4.** Análisis de la varianza y contrastes para los terpenos en las cavidades de los tricomas glandulares tipo VI de plantas de *S. habrochaites* LA2167. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450  $\mu$ M) en condiciones de luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL).

## Anexo II: Emisión de VOCs en cada tratamiento

### a. Tratamiento Amb-C

```
> anova(t1t.terpeno)
```

Analysis of Variance Table

Response: sqrt(Concentracion\_AmbC)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Terpeno	11	109.15	9.9228	21.238	6.528e-14 ***
Residuals	43	20.09	0.4672		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

\$contrasts

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
alfaCedreno - alfaCurcumeno	0.93010	0.731	43	1.273	0.9784
alfaCedreno - alfaPineno	1.37868	0.789	43	1.747	0.8363
alfaCedreno - Aloatomadendreno	1.27296	0.764	43	1.666	0.8735
alfaCedreno - Auzleno	1.58770	0.749	43	2.120	0.6118
alfaCedreno - betaElemeno	1.21861	0.789	43	1.544	0.9191
alfaCedreno - betaFarneseno	1.26487	0.749	43	1.689	0.8632
alfaCedreno - deltaElemeno	1.10587	0.731	43	1.513	0.9286
alfaCedreno - Dlimoneno	1.15587	0.789	43	1.464	0.9422
alfaCedreno - gamaElemeno	-1.65625	0.725	43	-2.284	0.5022
alfaCedreno - Valenceno	1.27527	0.764	43	1.669	0.8722
alfaCedreno - Zingibereno	-2.64134	0.749	43	-3.528	0.0414 ←
alfaCurcumeno - alfaPineno	0.44858	0.472	43	0.951	0.9980
alfaCurcumeno - Aloatomadendreno	0.34286	0.428	43	0.800	0.9996
alfaCurcumeno - Auzleno	0.65760	0.400	43	1.643	0.8829
alfaCurcumeno - betaElemeno	0.28851	0.472	43	0.612	1.0000
alfaCurcumeno - betaFarneseno	0.33477	0.400	43	0.836	0.9994
alfaCurcumeno - deltaElemeno	0.17577	0.365	43	0.481	1.0000
alfaCurcumeno - Dlimoneno	0.22578	0.472	43	0.479	1.0000
alfaCurcumeno - gamaElemeno	-2.58635	0.354	43	-7.311	<.0001 ←
alfaCurcumeno - Valenceno	0.34517	0.428	43	0.806	0.9996
alfaCurcumeno - Zingibereno	-3.57144	0.400	43	-8.923	<.0001 ←
alfaPineno - Aloatomadendreno	-0.10572	0.522	43	-0.203	1.0000
alfaPineno - Auzleno	0.20902	0.499	43	0.419	1.0000
alfaPineno - betaElemeno	-0.16007	0.558	43	-0.287	1.0000
alfaPineno - betaFarneseno	-0.11381	0.499	43	-0.228	1.0000
alfaPineno - deltaElemeno	-0.27281	0.472	43	-0.578	1.0000
					p.value
alfaPineno - Dlimoneno	-0.22280	0.558	43	-0.399	1.0000
alfaPineno - gamaElemeno	-3.03493	0.463	43	-6.558	<.0001 ←
alfaPineno - Valenceno	-0.10341	0.522	43	-0.198	1.0000
alfaPineno - Zingibereno	-4.02002	0.499	43	-8.053	<.0001 ←
Aloatomadendreno - Auzleno	0.31474	0.459	43	0.686	0.9999
Aloatomadendreno - betaElemeno	-0.05435	0.522	43	-0.104	1.0000
Aloatomadendreno - betaFarneseno	-0.00809	0.459	43	-0.018	1.0000
Aloatomadendreno - deltaElemeno	-0.16709	0.428	43	-0.390	1.0000
Aloatomadendreno - Dlimoneno	-0.11708	0.522	43	-0.224	1.0000
Aloatomadendreno - gamaElemeno	-2.92921	0.419	43	-6.998	<.0001 ←
Aloatomadendreno - Valenceno	0.00231	0.483	43	0.005	1.0000
Aloatomadendreno - Zingibereno	-3.91430	0.459	43	-8.537	<.0001 ←
Auzleno - betaElemeno	-0.36910	0.499	43	-0.739	0.9998
Auzleno - betaFarneseno	-0.32283	0.432	43	-0.747	0.9998
Auzleno - deltaElemeno	-0.48184	0.400	43	-1.204	0.9858
Auzleno - Dlimoneno	-0.43183	0.499	43	-0.865	0.9992
Auzleno - gamaElemeno	-3.24395	0.390	43	-8.325	<.0001 ←
Auzleno - Valenceno	-0.31244	0.459	43	-0.681	0.9999
Auzleno - Zingibereno	-4.22904	0.432	43	-9.783	<.0001 ←
betaElemeno - betaFarneseno	0.04627	0.499	43	0.093	1.0000
betaElemeno - deltaElemeno	-0.11274	0.472	43	-0.239	1.0000
betaElemeno - Dlimoneno	-0.06273	0.558	43	-0.112	1.0000
betaElemeno - gamaElemeno	-2.87486	0.463	43	-6.212	<.0001 ←
betaElemeno - Valenceno	0.05666	0.522	43	0.109	1.0000
betaElemeno - Zingibereno	-3.85995	0.499	43	-7.733	<.0001 ←
betaFarneseno - deltaElemeno	-0.15901	0.400	43	-0.397	1.0000
betaFarneseno - Dlimoneno	-0.10900	0.499	43	-0.218	1.0000
betaFarneseno - gamaElemeno	-2.92112	0.390	43	-7.496	<.0001 ←

					p.value
betaFarneseno - Valenceno	0.01039	0.459	43	0.023	1.0000
betaFarneseno - Zingibereno	-3.90621	0.432	43	-9.036	<.0001 ←
deltaElemeno - Dlimoneno	0.05001	0.472	43	0.106	1.0000
deltaElemeno - gamaElemeno	-2.76212	0.354	43	-7.808	<.0001 ←
deltaElemeno - Valenceno	0.16940	0.428	43	0.395	1.0000
deltaElemeno - Zingibereno	-3.74720	0.400	43	-9.362	<.0001 ←
Dlimoneno - gamaElemeno	-2.81213	0.463	43	-6.077	<.0001 ←
Dlimoneno - Valenceno	0.11939	0.522	43	0.229	1.0000
Dlimoneno - Zingibereno	-3.79721	0.499	43	-7.607	<.0001 ←
gamaElemeno - Valenceno	2.93152	0.419	43	7.004	<.0001 ←
gamaElemeno - Zingibereno	-0.98509	0.390	43	-2.528	0.3509
Valenceno - Zingibereno	-3.91661	0.459	43	-8.542	<.0001 ←

**Figura S5.** Análisis de la varianza y contrastes para los terpenos emitidos en forma de VOCs por las plantas de *S. habrochaites* LA2167. Las plantas fueron tratadas con una solución control sin MeJA (Control) en condiciones de luz blanca (Amb).

## b. Tratamiento Amb-MeJA

```
> anova(fit.terpeno)
```

Analysis of Variance Table

Response: sqrt(Concentracion\_AmbMeJA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Terpeno	8	58.159	7.2699	13.451	1.086e-06 ***
Residuals	21	11.350	0.5405		

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

\$contrasts

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
alfaCedreno - alfaCurcumeno	-0.5925	0.537	21	-1.103	0.9672
alfaCedreno - Aloatomadendreno	-0.1635	0.671	21	-0.244	1.0000
alfaCedreno - Auzleno	0.0567	0.600	21	0.094	1.0000
alfaCedreno - betaFarneseno	-0.3056	0.561	21	-0.544	0.9997
alfaCedreno - deltaElemeno	-0.4327	0.561	21	-0.771	0.9966
alfaCedreno - gamaElemeno	-2.9915	0.537	21	-5.572	0.0004 ←
alfaCedreno - Valenceno	-0.1248	0.671	21	-0.186	1.0000
alfaCedreno - Zingibereno	-4.5359	0.671	21	-6.759	<.0001 ←
alfaCurcumeno - Aloatomadendreno	0.4290	0.615	21	0.697	0.9983
alfaCurcumeno - Auzleno	0.6491	0.537	21	1.209	0.9455
alfaCurcumeno - betaFarneseno	0.2869	0.493	21	0.582	0.9995
alfaCurcumeno - deltaElemeno	0.1598	0.493	21	0.324	1.0000
alfaCurcumeno - gamaElemeno	-2.3990	0.465	21	-5.160	0.0011 ←
alfaCurcumeno - Valenceno	0.4677	0.615	21	0.760	0.9969
alfaCurcumeno - Zingibereno	-3.9435	0.615	21	-6.411	0.0001 ←
Aloatomadendreno - Auzleno	0.2201	0.671	21	0.328	1.0000
Aloatomadendreno - betaFarneseno	-0.1421	0.637	21	-0.223	1.0000
Aloatomadendreno - deltaElemeno	-0.2692	0.637	21	-0.423	1.0000
Aloatomadendreno - gamaElemeno	-2.8280	0.615	21	-4.598	0.0040 ←
Aloatomadendreno - Valenceno	0.0387	0.735	21	0.053	1.0000
Aloatomadendreno - Zingibereno	-4.3725	0.735	21	-5.948	0.0002 ←
Auzleno - betaFarneseno	-0.3622	0.561	21	-0.645	0.9990
Auzleno - deltaElemeno	-0.4893	0.561	21	-0.871	0.9923
Auzleno - gamaElemeno	-3.0481	0.537	21	-5.677	0.0003 ←
Auzleno - Valenceno	-0.1815	0.671	21	-0.270	1.0000
Auzleno - Zingibereno	-4.5926	0.671	21	-6.843	<.0001 ←
betaFarneseno - deltaElemeno	-0.1271	0.520	21	-0.244	1.0000
betaFarneseno - gamaElemeno	-2.6859	0.493	21	-5.446	0.0006 ←
betaFarneseno - Valenceno	0.1808	0.637	21	0.284	1.0000
betaFarneseno - Zingibereno	-4.2304	0.637	21	-6.644	<.0001 ←
deltaElemeno - gamaElemeno	-2.5588	0.493	21	-5.189	0.0010 ←
deltaElemeno - Valenceno	0.3079	0.637	21	0.484	0.9999
deltaElemeno - Zingibereno	-4.1033	0.637	21	-6.445	0.0001 ←
gamaElemeno - Valenceno	2.8667	0.615	21	4.661	0.0035 ←
gamaElemeno - Zingibereno	-1.5445	0.615	21	-2.511	0.2814
Valenceno - Zingibereno	-4.4111	0.735	21	-6.000	0.0002 ←



Aloaromadendreno - Zingibereno	-2.71922	0.550	19	-4.942	0.0033	←
Auzleno - betaElemeno	-0.01545	0.364	19	-0.042	1.0000	
Auzleno - betaFarneseno	-0.01692	0.413	19	-0.041	1.0000	
Auzleno - deltaElemeno	-0.13482	0.364	19	-0.370	1.0000	
Auzleno - DLimoneno	-0.00552	0.337	19	-0.016	1.0000	
Auzleno - gamaElemeno	-2.24700	0.364	19	-6.174	0.0003	←
Auzleno - Valenceno	-0.05053	0.413	19	-0.122	1.0000	
Auzleno - Zingibereno	-2.95162	0.364	19	-8.110	<.0001	←
betaElemeno - betaFarneseno	-0.00147	0.435	19	-0.003	1.0000	
betaElemeno - deltaElemeno	-0.11937	0.389	19	-0.307	1.0000	
betaElemeno - DLimoneno	0.00993	0.364	19	0.027	1.0000	
betaElemeno - gamaElemeno	-2.23155	0.389	19	-5.735	0.0006	←
betaElemeno - Valenceno	-0.03508	0.435	19	-0.081	1.0000	
betaElemeno - Zingibereno	-2.93617	0.389	19	-7.546	<.0001	←
betaFarneseno - deltaElemeno	-0.11790	0.435	19	-0.271	1.0000	
betaFarneseno - DLimoneno	0.01140	0.413	19	0.028	1.0000	
betaFarneseno - gamaElemeno	-2.23008	0.435	19	-5.126	0.0022	←
betaFarneseno - Valenceno	-0.03361	0.477	19	-0.071	1.0000	
betaFarneseno - Zingibereno	-2.93470	0.435	19	-6.746	0.0001	←
deltaElemeno - DLimoneno	0.12930	0.364	19	0.355	1.0000	
deltaElemeno - gamaElemeno	-2.11218	0.389	19	-5.429	0.0012	←
deltaElemeno - Valenceno	0.08429	0.435	19	0.194	1.0000	
deltaElemeno - Zingibereno	-2.81680	0.389	19	-7.239	<.0001	←
DLimoneno - gamaElemeno	-2.24148	0.364	19	-6.159	0.0003	←
DLimoneno - Valenceno	-0.04501	0.413	19	-0.109	1.0000	
DLimoneno - Zingibereno	-2.94610	0.364	19	-8.095	<.0001	←
gamaElemeno - Valenceno	2.19647	0.435	19	5.049	0.0026	←
gamaElemeno - Zingibereno	-0.70462	0.389	19	-1.811	0.7609	
Valenceno - Zingibereno	-2.90109	0.435	19	-6.669	0.0001	←

**Figura S7.** Análisis de la varianza y contrastes para los terpenos emitidos en forma de VOCs por las plantas de *S. habrochaites* LA2167. Las plantas fueron tratadas con una solución control sin MeJA (Control) en condiciones de luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL).

#### d. Tratamiento RL-MeJA

```
> anova(fit.terpeno)
```

Analysis of Variance Table

Response: sqrt(Concentracion\_RLMeJA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Terpeno	9	78.161	8.6846	13.921	2.622e-05 ***
Residuals	13	8.110	0.6238		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Scontrasts					
contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
alfaCedreno - alfaCurcumeno	-0.311924	0.883	13	-0.353	1.0000
alfaCedreno - alfaPineno	0.198763	0.967	13	0.205	1.0000
alfaCedreno - Aloaromadendreno	0.117160	0.967	13	0.121	1.0000
alfaCedreno - Auzleno	0.221074	0.912	13	0.242	1.0000
alfaCedreno - betaFarneseno	-0.099584	0.967	13	-0.103	1.0000
alfaCedreno - deltaElemeno	-3.988639	0.967	13	-4.123	0.0271 ←
alfaCedreno - gamaElemeno	-4.157983	0.912	13	-4.559	0.0130 ←
alfaCedreno - Valenceno	-0.311716	1.117	13	-0.279	1.0000
alfaCedreno - Zingibereno	-3.490229	0.912	13	-3.827	0.0447 ←
alfaCurcumeno - alfaPineno	0.510687	0.684	13	0.747	0.9983
alfaCurcumeno - Aloaromadendreno	0.429084	0.684	13	0.627	0.9996
alfaCurcumeno - Auzleno	0.532997	0.603	13	0.884	0.9944
alfaCurcumeno - betaFarneseno	0.212339	0.684	13	0.310	1.0000
alfaCurcumeno - deltaElemeno	-3.676716	0.684	13	-5.375	0.0033 ←
alfaCurcumeno - gamaElemeno	-3.846060	0.603	13	-6.376	0.0007 ←
alfaCurcumeno - Valenceno	0.000207	0.883	13	0.000	1.0000
alfaCurcumeno - Zingibereno	-3.178306	0.603	13	-5.269	0.0040 ←
alfaPineno - Aloaromadendreno	-0.081603	0.790	13	-0.103	1.0000
alfaPineno - Auzleno	0.022311	0.721	13	0.031	1.0000
alfaPineno - betaFarneseno	-0.298348	0.790	13	-0.378	1.0000
alfaPineno - deltaElemeno	-4.187402	0.790	13	-5.302	0.0038 ←
alfaPineno - gamaElemeno	-4.356746	0.721	13	-6.043	0.0012 ←
alfaPineno - Valenceno	-0.510480	0.967	13	-0.528	0.9999
alfaPineno - Zingibereno	-3.688993	0.721	13	-5.116	0.0051 ←
Aloaromadendreno - Auzleno	0.103913	0.721	13	0.144	1.0000
Aloaromadendreno - betaFarneseno	-0.216745	0.790	13	-0.274	1.0000
Aloaromadendreno - deltaElemeno	-4.105800	0.790	13	-5.198	0.0045 ←
Aloaromadendreno - gamaElemeno	-4.275143	0.721	13	-5.929	0.0014 ←
Aloaromadendreno - Valenceno	-0.428877	0.967	13	-0.443	1.0000
Aloaromadendreno - Zingibereno	-3.607390	0.721	13	-5.003	0.0062 ←
Auzleno - betaFarneseno	-0.320658	0.721	13	-0.445	1.0000
Auzleno - deltaElemeno	-4.209713	0.721	13	-5.839	0.0016 ←
Auzleno - gamaElemeno	-4.379057	0.645	13	-6.790	0.0004 ←
Auzleno - Valenceno	-0.532790	0.912	13	-0.584	0.9998
Auzleno - Zingibereno	-3.711303	0.645	13	-5.755	0.0018 ←
betaFarneseno - deltaElemeno	-3.889055	0.790	13	-4.924	0.0070 ←
betaFarneseno - gamaElemeno	-4.058399	0.721	13	-5.629	0.0022 ←
betaFarneseno - Valenceno	-0.212132	0.967	13	-0.219	1.0000
betaFarneseno - Zingibereno	-3.390645	0.721	13	-4.703	0.0102 ←
deltaElemeno - gamaElemeno	-0.169344	0.721	13	-0.235	1.0000
deltaElemeno - Valenceno	3.676923	0.967	13	3.801	0.0467 ←
deltaElemeno - Zingibereno	0.498410	0.721	13	0.691	0.9991
gamaElemeno - Valenceno	3.846267	0.912	13	4.217	0.0231 ←
gamaElemeno - Zingibereno	0.667754	0.645	13	1.035	0.9836
Valenceno - Zingibereno	-3.178513	0.912	13	-3.485	0.0790

**Figura S8.** Análisis de la varianza y contrastes para los terpenos emitidos en forma de VOCs por las plantas de *S. habrochaites* LA2167. Las plantas fueron inducidas con aplicación foliar de Metil Jasmonato (MeJA, 450  $\mu$ M) en condiciones de luz blanca enriquecida con rojo lejano (RL).



El manuscrito es la última versión de la tesis e incluye las correcciones de los jurados.



---

Firma del autor

Stephanie Thompson

---

Aclaración del autor



---

Firma del director

Milena E. Manzur

---

Aclaración del director