

Papel de *MTS1* y *S5H* en la respuesta
defensiva de plantas de tomate frente a la
infección con la bacteria *Pseudomonas*
syringae

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Realizado por:
Samuel Minguillón Campos

Directores:
Dra. M^a Purificación Lisón Párraga
Dra. M^a Pilar López Gresa

Máster de Biotecnología Molecular y
Celular de Plantas
Valencia, enero 2018

RESUMEN

A lo largo de la evolución, las plantas han ido desarrollando sistemas de defensa frente a diversas agresiones abióticas y bióticas por parte de su entorno. Estos sistemas defensivos incluyen tanto barreras constitutivas como defensas inducibles. En respuesta a las señales de estrés, las plantas sintetizan proteínas de defensa y compuestos químicos de diversa naturaleza. Estos compuestos pueden ejercer funciones defensivas directas, esto es, actuando como antioxidantes, antibacterianos o antifúngicos, o actuar como metabolitos defensivos indirectos, señalizando la respuesta defensiva. Los compuestos fenólicos y los alcaloides, así como algunos compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de menor polaridad y peso molecular, pertenecen a este grupo de compuestos defensivos.

En el presente Trabajo de Fin de Máster nos planteamos el estudio de la función de una monoterpensintasa (*MTS1*) y de una salicilato 5-hidroxilasa (*S5H*) en la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Ambos genes participan en el metabolismo secundario de las plantas. *MTS1* interviene en la producción de VOCs monoterpénicos, tales como el α -terpineol, cuya aplicación exógena produce el cierre estomático. Por su parte, *S5H* participa en la degradación del ácido salicílico (SA) a ácido gentísico (GA), siendo ambos, compuestos fenólicos defensivos.

En la primera parte del trabajo, hemos observado que la sobreexpresión de *MTS1* produce un aumento en la emisión de varios monoterpenos capaces de producir el cierre estomático en plantas vecinas no transgénicas. Puesto que una de las posibles vías de entrada de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* son los estomas, hemos evaluado la posible resistencia de estas plantas transgénicas, así como de sus vecinas, frente a la infección bacteriana. Sin embargo, la mayor emisión de monoterpenos observada no es suficiente para producir una mayor resistencia a la bacteria, ni en las propias plantas transgénicas, ni en las no transgénicas. Nuestros resultados sugieren que los terpenoides desempeñan una función en la comunicación entre plantas, haciendo de las plantas transgénicas que sobreexpresan *MTS1* una futura herramienta biotecnológica.

Con respecto al papel de *S5H* en la respuesta defensiva, hemos visto que existe una correlación entre su expresión y la acumulación de su producto, el GA, en plantas de tomate infectadas con diferentes agentes patogénicos. Asimismo, líneas transgénicas de silenciamiento en dicho gen (*RNAi_S5H*) presentan unos niveles basales de SA superiores a las de sus correspondientes plantas control. Por otra parte, las plantas transgénicas *RNAi_S5H* infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, presentan una disminución en los niveles de GA y una mayor resistencia a la infección bacteriana, confirmando así la actividad *in vivo* de este enzima y su función en la respuesta defensiva. Por último, hemos observado un fenotipo de senescencia avanzada en estas plantas transgénicas, sugiriendo que el catabolismo del SA desempeña un papel importante en la senescencia de las plantas.

ABSTRACT

Throughout evolution, plants have been developing defence systems against different abiotic and biotic aggressions by their environment. These defensive systems include both constitutive and inducible defences. In response to stress signals, plants synthesize defence proteins and different chemical compounds. These compounds can carry out direct defensive functions, that is, acting like antioxidants, antibacterial or antifungal. Phenolic compounds and alkaloids, as well as some volatile organic compounds (VOCs) with less polarity and molecular weight, belong to this defensive compounds group.

In this Master's degree final project we propose the study of the function of a new monoterpene synthase (MTS1) and a salicylic acid 5-hydroxylase (S5H) in tomato plants defensive response against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* bacteria. Both genes are involved in plants secondary metabolism. *MTS1* takes part in the production of monoterpene VOCs, such as α -terpineol, whose application produces stomatal close. On its behalf, *S5H* takes part in salicylic acid (SA) degradation to gentisic acid (GA), both defensive phenolic compounds.

In the first part of the project, we have observed that *MTS1* overexpression produces an increase in some monoterpenes emission which are capable of producing stomatal closing in neighbour non-transgenic plants. Due to one of the possible entry sites for *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* are stomata, we have evaluated the possible resistance of these transgenic plants, as well as their neighbour plants, against bacterial infection. However, the highest emission of monoterpenes shown is not enough to induce more resistance against the bacteria, neither in transgenic plants nor non-transgenic plants. Our results suggest that terpenoids play a function in interplant communication, doing of overexpression transgenic plants *MTS1* a future biotechnological tool.

Regarding the *S5H* role in defensive response, we have observed that a correlation between their expression and their product accumulation exists, the GA, in infected tomato plants with different pathogenic agents. Likewise, silencing transgenic lines in this gene (*RNAi_S5H*) shows higher SA basal levels than control plants. On the other hand, infected *RNAi_S5H* transgenic plants with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, exhibit a decrease in GA levels and higher resistance against bacterial infection, confirming the *in vivo* activity of this enzyme and their function in defensive response. Ultimately, we have seen an advanced senescence phenotype in transgenic plants, suggesting that SA catabolism plays an important role in plants senescence.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO	1
1.1 El sistema defensivo de las plantas	1
1.2 Percepción del patógeno	2
1.3 Respuesta defensiva de las plantas frente a la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	5
2. EL METABOLISMO SECUNDARIO EN EL SISTEMA DEFENSIVO DE LAS PLANTAS	8
2.1 Terpenos	9
2.2 Compuestos Fenólicos	12
II. OBJETIVOS	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	19
1.1 Germinación de semillas	19
1.2 Condiciones de cultivo	20
2. MATERIAL MICROBIOLÓGICO Y PROCESO DE INFECCIÓN	21
2.1 Preparación del inóculo bacteriano	22
2.2 Infección bacteriana	22
3. TOMA DE MUESTRA	22
4. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO BACTERIANO	23
4.1 Conteo bacteriano en hoja de tomate	23
4.2 Medidas de conductividad por fuga de electrolitos	24
5. ESTUDIOS DE COMUNICACIÓN ENTRE PLANTAS	25
6. MEDIDAS DE LA APERTURA ESTOMÁTICA	25
7. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE TRANSCRITOS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)	26
7.1 Extracción de RNA total	26
7.3 Precipitación de RNA con cloruro de litio (LiCl)	27
7.4 Tratamiento con DNasa	27
7.5 Retrotranscripción	27
7.6 Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)	28
8. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	28
9. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS	29
9.1 Extracción de compuestos fenólicos totales	30
9.2 Extracción de compuestos fenólicos libres	30
9.3 Análisis y cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	30
10. RECURSOS INFORMÁTICOS	31

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
1. IMPLICACIÓN DE MTS1 EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO	32
Antecedentes	32
1.1 Análisis de VOCs de plantas 35S:MTS1 ante una infección bacteriana	33
1.2 Estudio de la resistencia de plantas 35S:MTS1 frente a una infección bacteriana	35
1.3 Estudio del efecto de plantas 35S:MTS1 sobre plantas vecinas: activación del cierre estomático	37
1.4 Estudio del efecto de plantas 35S:MTS1 sobre plantas vecinas: activación de resistencia frente a una infección bacteriana	38
2. CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA SALICILATO 5-HIDROXILASA (S5H) EN PLANTAS DE TOMATE	40
Antecedentes	40
2.1 Estudio de la expresión de S5H en plantas de tomate ante diferentes infecciones	41
2.2 Niveles de expresión de S5H en plantas de tomate transgénicas RNAi_S5H	44
2.3 Estudio de compuestos fenólicos libres y totales	44
2.4 Crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> en plantas de tomate RNAi_S5H infectadas	47
2.5 Estudio de senescencia asociada a S5H	48
V. CONCLUSIONES	52
VI. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo en 'zig-zag' del sistema inmunológico de las plantas propuesto por Jones y Dangl.	3
Figura 2. Modelo gen-a-gen propuesto por Flor.	4
Figura 3. Mecanismo de evasión de la respuesta defensiva por SA a través de la toxina coronatina (COR).	7
Figura 4. Diagrama del ciclo de infección de <i>Pseudomonas syringae</i> .	8
Figura 5. Formación de los precursores terpenoides.	10
Figura 6. Biosíntesis y metabolismo del SA en plantas.	14
Figura 7. Reacción de hidroxilación en el C5 del SA por la salicilato 5-hidroxilasa.	16
Figura 8. Representación de una hoja de tomate.	23
Figura 9. Representación de la medida del ancho (D) y el alto (d) de un estoma tipo.	26
Figura 10. Emisión de VOCs de hojas de tomate MoneyMaker 35S:MTS1 y pGreen ante una infección bacteriana.	34
Figura 11. Crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (A) y muerte celular (B) de plantas de tomate 35S:MTS1 y pGreen.	36
Figura 12. Ratio de apertura estomática de plantas de tomate pGreen en presencia o ausencia de plantas transgénicas 35S:MTS1.	37
Figura 13. Crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> tras los tratamientos en cámaras de metacrilato.	39
Figura 14. Análisis de expresión de S5H ante diferentes infecciones en plantas de tomate MoneyMaker.	43
Figura 15. Análisis de expresión de S5H de las distintas líneas transgénicas de tomate MoneyMaker.	44
Figura 16. Acumulación de GA total en plantas de tomate MoneyMaker control y transgénicas infectadas con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> Δ AvrPto.	45
Figura 17. Acumulación de SA libre y total en plantas de tomate MoneyMaker control y transgénicas infectadas con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> Δ AvrPto.	46
Figura 18. Crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> Δ AvrPto en hojas de plantas MoneyMaker control y en plantas transgénicas RNAi_S5H.	47
Figura 19. Evolución de la senescencia en folíolos de tomate MM y RNAi_S5H.	49
Figura 20. Cuarta hoja de plantas MoneyMaker control y transgénicas de silenciamiento en S5H.	49
Figura 21. Expresión de PR1 en plantas MoneyMaker control y en las transgénicas RNAi_S5H a lo largo del desarrollo.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición y preparación de 1L de medio de germinación. _____	20
Tabla 2. Composición y preparación de 1L de medio de cultivo bacteriano LB agar. _____	21
Tabla 3. Composición y preparación de 1L de medio de cultivo bacteriano King B líquido. _____	21
Tabla 4. Composición y preparación de 1L de medio de cultivo bacteriano King B agar. _____	24
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados como cebadores en los experimentos de qRT-PCRs. _____	28

ABREVIATURAS

2,3-DHBA: 2,3-dihidroxibenzoico

CEVd: Viroide de la Exocortis de los Cítricos

Cfu: Unidades formadora de colonias

COR: Coronatina

DAMPs: *Damage-Associated Molecular Patterns*

DMAPP: Dimetilalil pirofosfato

dpi: Días post-infección

ETI: Respuesta defensiva activada por efectores

ETS: Susceptibilidad desencadenada por efectores

GA: Ácido gentísico

GC-MS: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

GLVs: *Green leaf volátiles*

hpi: Horas post-infección

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HR: Respuesta o reacción hipersensible

IPP: Isopentenil pirofosfato

JA: Ácido jasmónico

MAMPs: *Microbe-Associated Molecular Patterns*

MM: MoneyMaker

MTS1 (gen)/MTS1 (enzima): Monoterpeno sintasa 1

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PR: *Pathogenesis-Related Proteins*

PR1 (gen)/PR1 (proteína):
PATHOGENESIS-RELATED1

PRRs: *Pattern Recognition Receptors*

Pst: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

PTI: Respuesta defensiva activada por PAMPs

ROS: Especies reactivas de oxígeno

S3H (gen)/S3H (enzima): Salicilato 3-hidroxilasa

S5H (gen)/S5H (enzima): Salicilato 5-hidroxilasa

SA: Ácido salicílico

SAR: Respuesta sistémica adquirida

spi: Semanas post-infección

ToMV: Virus del Mosaico del Tomate

TSWV: Virus del Bronceado del Tomate

VOCs: Compuestos volátiles orgánicos

1. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

El óptimo crecimiento y rendimiento de las plantas depende de su respuesta adaptativa ante las variaciones que presenta el ambiente que las rodea, esto incluye la disponibilidad de agua, luz, temperatura y nutrientes del suelo donde se desarrollan, conocido como estrés abiótico, así como el ataque de otros seres vivos desde herbívoros hasta microorganismos, conocido como estrés biótico.

El estudio de las interacciones planta-patógeno es de vital importancia puesto que, debido a su naturaleza sésil, las plantas no son capaces de huir del peligro, por lo que han de hacerle frente y combatirlo. De hecho, gracias al amplio abanico de respuestas que han desarrollado las plantas a lo largo de su evolución, en la mayoría de los casos la enfermedad es más la excepción que la regla.

1.1 El sistema defensivo de las plantas

Por lo general, las plantas pueden contrarrestar el ataque de los patógenos debido a las barreras físicas y químicas preexistentes a la infección. La presencia de estos elementos estructurales, tales como los recubrimientos de cera o la presencia de tricomas, entre otros; así como la defensa química constituida por compuestos tóxicos para el patógeno (fenólicos, taninos, alcaloides, etc.) o enzimas que contribuyen a la resistencia de la infección (glucanasas, quitinasas,...), componen la primera línea de protección de la planta, conocida como *resistencia pasiva* o *defensa constitutiva* de las plantas (Agrios, 2013).

Si el patógeno es capaz de superar esta primera línea defensiva, las plantas responden con otro tipo de resistencia, denominada *activa* o *inducible*, cuyo desarrollo está supeditado al reconocimiento por parte de la planta de inductores patogénicos o elicitores que posee el patógeno. Dependiendo de la especificidad del reconocimiento, se desencadenan en la planta diferentes respuestas defensivas como pueden ser la respuesta defensiva activada por PAMPs (PTI) o la respuesta defensiva activada por efectores (ETI) (Jones y Dangl, 2006; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Jeandet *et al.*, 2013; Nakahara y Masuta, 2014).

1.2 Percepción del patógeno

○ Reconocimiento inespecífico: respuesta defensiva activada por PAMPs (PTI)

La primera respuesta inmune en las plantas se induce por el reconocimiento inespecífico de los denominados PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), que son patrones moleculares asociados a patógenos y que se encuentran conservados en un tipo de microorganismos. Los PAMPs son reconocidos por una gran variedad de especies, mediante unos receptores transmembrana situados en las células vegetales conocidos como PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), que contienen un dominio de reconocimiento del ligando extracelular, a menudo fusionado a un dominio intracelular de señalización de tipo quinasas.

La activación de los PRRs induce una batería de respuestas en la planta infectada que la prepara ante la invasión patogénica, provocando cambios tanto químicos como estructurales. Entre estas respuestas cabe destacar: la inducción del cierre estomático, las deposiciones de callosa y lignina para reforzar la pared celular (Hückelhoven, 2007), la activación de proteín-quinasas, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), la síntesis de proteínas de defensa PR (*Pathogenesis-Related Proteins*) y diferentes cambios en la expresión génica. Todos estos cambios conforman lo que se conoce como PTI (*PAMP Triggered Immunity*; **Figura 1**).

Además de ser activada por PAMPs, la PTI puede inducirse por otros factores tales como los MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*), cuya principal diferencia con los anteriormente descritos es que se conservan tanto entre microorganismos patógenos, no patógenos y saprofitos (Newman *et al.*, 2013); o los DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*), que se trata de los productos de degradación de la planta consecuencia del ataque patogénico (Matzinger, 2007; Boller y Felix, 2009; Yamaguchi y Huffaker, 2011).

○ Reconocimiento específico: respuesta defensiva activada por efectores (ETI)

Algunos patógenos han desarrollado una manera de eludir la PTI, mediante la producción de efectores o factores de avirulencia (*Avr*). Para contrarrestarlo las plantas han evolucionado sintetizando los productos de los genes de resistencia *R*, que detectan los efectores impidiendo el desarrollo de la enfermedad (**Figura 1**; Jones y Dangl, 2006).

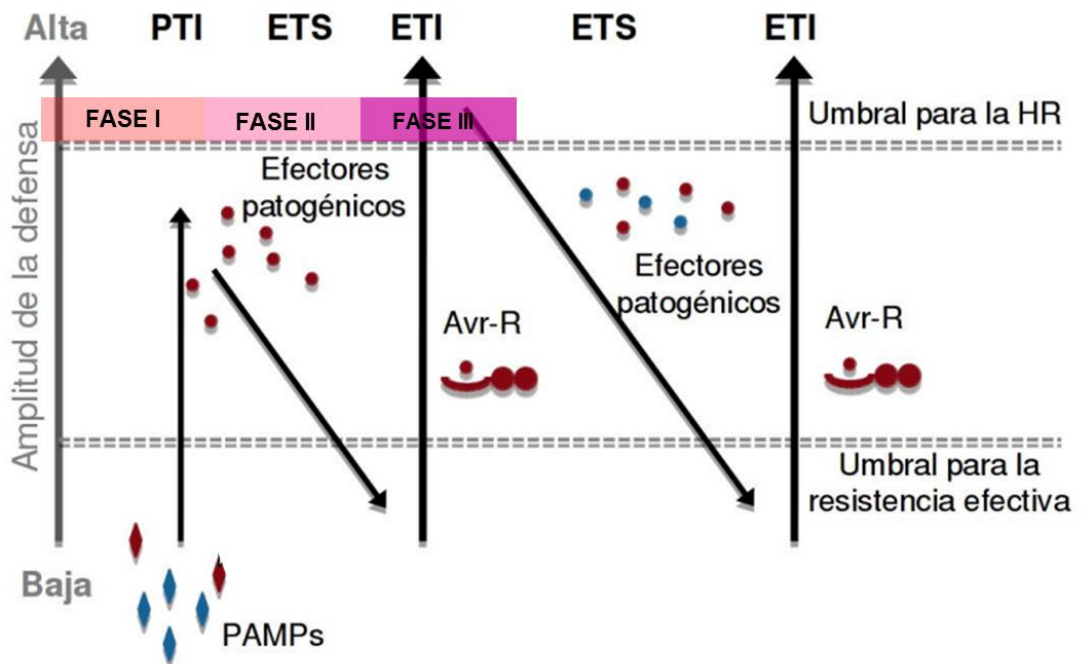


Figura 1. Modelo en 'zig-zag' del sistema inmunológico de las plantas propuesto por Jones y Dangl. En la Fase I, la planta detecta los PAMPs/DAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns/Danger-Associated Molecular Patterns*) mediante receptores de membrana PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) inespecíficos, activándose la PTI, (*PAMP Triggered Immunity*). En la Fase II, hay algunos patógenos adaptados específicamente a un tipo de hospedador que poseen efectores evolucionados, muchos de los cuales se secretan en el citoplasma del huésped para suprimir la PTI, produciendo lo que se denomina susceptibilidad desencadenada por efectores (*Effector-Triggered Susceptibility, ETS*). En la Fase III, un determinado efector o factor de avirulencia (*Avr*) es reconocido específicamente por una proteína R, activando la inmunidad ligada al efector (*ETI, Effector Triggered Immunity*) (adaptado de Jones y Dangl, 2006).

Según el modelo de interacción *gen-a-gen* (Figura 2; Flor, 1971) hay dos tipos de interacciones planta-patógeno, en función de si se produce o no interacción entre un producto codificado por el gen *R* de la planta y un factor de avirulencia del patógeno codificado por el gen *Avr*. El desarrollo de una interacción *compatible* o *incompatible*, determinará, respectivamente, si se desarrolla la enfermedad o no.

Cuando tiene lugar el reconocimiento entre los productos de *R* y *Avr*, la interacción que se produce entre planta y patógeno es de tipo *incompatible*, desarrollándose en la planta un nuevo nivel defensivo conocido como ETI (*Effector Triggered Immunity*). Comparada con la PTI, la ETI generalmente es una defensa de la planta más robusta, ya que desencadena la respuesta o reacción hipersensible (*Hypersensitive Response/Reaction, HR*), lo que se traduce en un proceso de muerte celular programada alrededor del punto de entrada del patógeno, de manera que lo aísla y evita su expansión hacia aquellos tejidos que todavía no han sido infectados (Riedlmeier *et al.*, 2017). Asimismo, esta HR va acompañada de una respuesta de defensa inducible conocida como resistencia sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance, SAR*). Se trata de una inmunidad

dependiente de ácido salicílico (SA) y de larga duración contra un amplio espectro frente a posibles infecciones futuras de patógenos (hemi)-biótrosos (Ryals *et al.*, 1996; Beckers y Spoel, 2006; Conrath, 2006; Kachroo y Robin, 2013). Tanto el establecimiento de PTI como el de ETI promueven la acumulación de ácido salicílico (SA) y la expresión de genes relacionados con esta hormona en tejidos infectados y también en aquellos no infectados o distales (más detallado en el apartado 2.2.1).

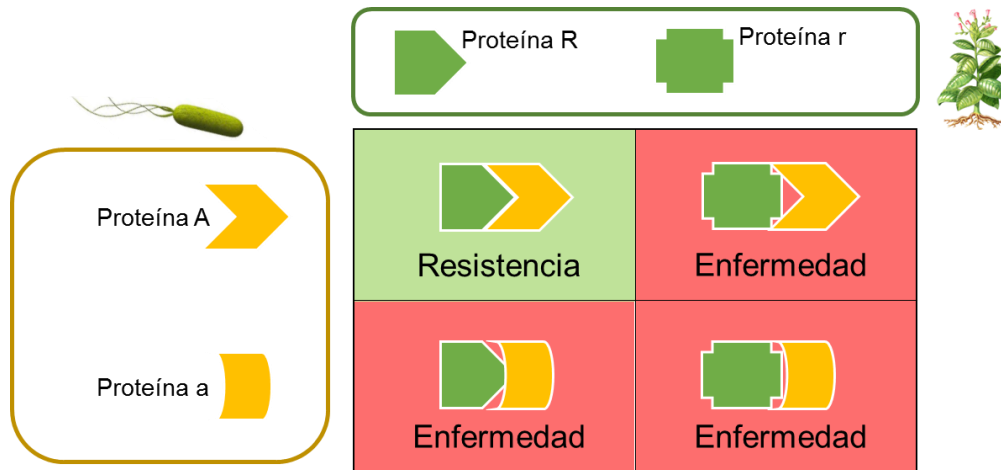


Figura 2. Modelo gen-a-gen propuesto por Flor. Para que se produzca resistencia por parte de la planta frente a la enfermedad (interacción incompatible) es necesaria la presencia del gen dominante tanto en planta como en patógeno. La alteración o delección del gen dominante (*R* por *r* en planta, y *Avr-A* por *avr-a* en patógeno) conllevará a una interacción de tipo compatible que resultará en el desarrollo de la enfermedad, ya que la planta no es capaz de reconocer al patógeno y no activará ningún tipo de respuesta defensiva.

Por el contrario, si no se produce la interacción entre los productos de los genes *R* y *Avr*, la enfermedad se desarrolla en la planta. Este tipo de interacción entre planta y patógeno se denomina *compatible*, y a diferencia de la anterior, la propagación del patógeno a lo largo de la planta es exitosa puesto que no hay activación de la HR y por consiguiente tampoco de la SAR. En este tipo de interacciones tiene lugar la acumulación de ácido gentísico (GA) que ha sido propuesto como una molécula señal complementaria al SA en este tipo de interacciones (más detallado en el apartado 2.2.2)

Un ejemplo de este reconocimiento *gen-a-gen* es el que se produce entre la variedad de tomate Rio Grande, portadora del gen de resistencia *Pto*, cuyo producto es capaz de reconocer el codificado por el gen *AvrPto* que está presente en el genoma de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Ronald *et al.*, 1992).

1.3 Respuesta defensiva de las plantas frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

La interacción del patógeno *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*) con las hojas de sus plantas hospedadoras es uno de los ejemplos mejor estudiados de interacción planta-patógeno, y por lo tanto un modelo ideal en el cual explorar los mecanismos que se activan en la planta durante el desarrollo de la respuesta defensiva.

○ La bacteria *Pseudomonas syringae*

P. syringae fue inicialmente aislada de la planta de lila enferma (*Syringa vulgaris* L.) por M. W. Beijerinck en 1899 y posteriormente fue caracterizada y nombrada por C. J. J. van Hall (Young, 1991), otorgándole el nombre específico de la planta donde la bacteria fue encontrada por primera vez. Aunque en un principio se consideraron más de 40 especies, actualmente todas ellas están clasificadas bajo una sola, *P. syringae*; la cual pertenece al *phylum* Proteobacteria. Se caracteriza por ser una bacteria Gram-, aerobia estricta y cuya morfología presenta una forma de bastón, con flagelos polares (Hirano y Upper, 2000).

La especie *P. syringae* ha evolucionado para interactuar con una amplia gama de plantas en la mayoría de las regiones del mundo. La especificidad que presenta esta especie con respecto a las posibles plantas huésped con las que interactuar es la base de la agrupación de *P. syringae* en patovares (pv). Actualmente, se reconocen aproximadamente 50 patovares, y cada uno se puede dividir en múltiples razas si nos basamos en las interacciones diferenciales con los cultivares de una misma especie de planta. Sin embargo, todas las cepas tienen las siguientes características comunes: producen pigmentos fluorescentes, son negativas para la actividad oxidasa, son incapaces de pudrir la patata y son capaces de producir arginina dihidrolasa y de provocar una respuesta hipersensible en plantas de tabaco (Xin y He, 2013; Baltrus *et al.*, 2017).

En 1991, se describió que la cepa DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*) no sólo infectaba a su hospedador natural, el tomate, sino que también era capaz de infectar plantas de *Arabidopsis thaliana*. Esta cepa *Pst* DC3000 es resistente al antibiótico rifampicina y fue obtenida a partir de otra preexistente (*Pst* DC52) por el Dr. Cuppels (Whalen, 1991; Xin y He, 2013). Esta capacidad para infectar tanto tomate como *Arabidopsis* motivó a muchos laboratorios a utilizarla en el estudio de las interacciones planta-bacteria.

Mediante una tinción bacteriana de la población epífita de *Pst* DC3000 en hojas de tomate, diferenciando visualmente la proporción de bacterias vivas y muertas, se sugiere que la cepa DC3000 es un patógeno epífita relativamente débil (Boureau *et al.*, 2002), lo que quiere decir que si no puede ingresar a los tejidos de las hojas después de la inoculación, muere rápidamente. A pesar de esto, *Pst* DC3000 es un patógeno altamente agresivo una vez dentro de los tejidos del huésped, dándole la nominación de hemibiótrofo. Por esta razón, parece ser adecuado para el estudio de los mecanismos de invasión bacteriana y la patogénesis que desarrolla en el interior del apoplasto.

○ **Percepción de la bacteria *Pseudomonas syringae*, señalización y cierre estomático**

El reconocimiento *gen-a-gen* entre el producto del gen de resistencia *Pto* de la variedad de tomate Rio Grande, y el codificado por el gen *AvrPto* presente en el genoma de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Ronald *et al.*, 1992) produce la activación de la ETI. Asimismo, la respuesta local inmune en los sitios de reconocimiento de *P. syringae* podría conducir posteriormente a una resistencia sistémica contra la bacteria en toda la planta, descrita anteriormente como SAR (Durrant y Dong, 2004). Esta respuesta requiere de la acumulación de ácido salicílico (SA) para su desarrollo (Vlot *et al.*, 2009).

En contraste con el SA, la hormona vegetal jasmonato o ácido jasmónico (JA), mejor conocido por su papel en la defensa de plantas contra insectos y patógenos necrótrofos, generalmente promueve la infección por *P. syringae* a través de la relación antagonista que posee con el SA (Zheng *et al.*, 2012; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2017; **Figura 3**).

Se conoce el papel activo de los estomas en la limitación de la infección bacteriana (Melotto *et al.*, 2008, 2017; **Figura 4**). El cierre estomático da como resultado una entrada bacteriana reducida en las hojas de la planta, lo que tiene un impacto negativo en la efectividad de los patógenos foliares para colonizar la planta. Debido a que los estomas también están regulados por condiciones ambientales, como la humedad, es muy probable que algunas de bacterias epífitas dependan de condiciones climáticas favorables (por ejemplo, tormentas, lluvias y alta humedad), bajo las cuales se ve comprometido el cierre estomático o en las que se producen heridas en la superficie, siendo ocasiones idóneas para ingresar en el interior de la planta.

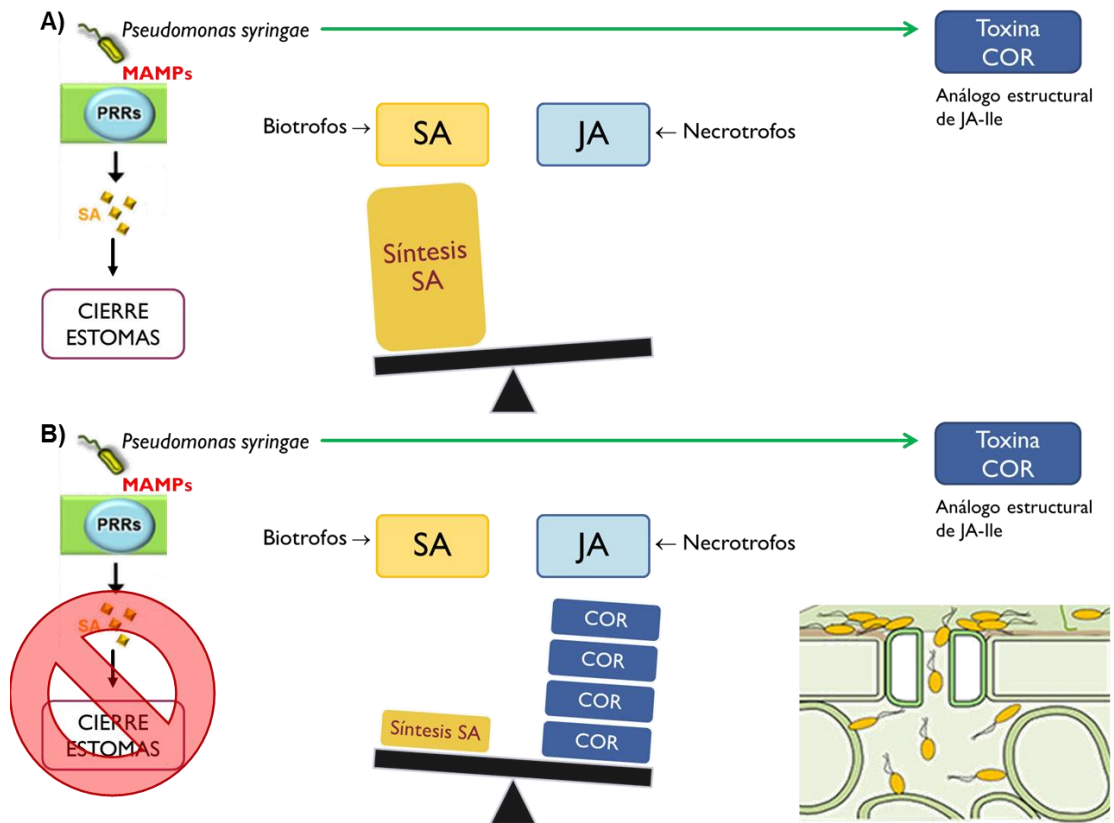


Figura 3. Mecanismo de evasión de la respuesta defensiva por SA a través de la toxina coronatina (COR). *Pseudomonas syringae* es capaz de sintetizar una toxina, la coronatina (COR), la cual es análogo estructural y funcional de la molécula JA-isoleucina (JA-Ile). Esta toxina hace que la planta desarrolle una respuesta defensiva mediada por JA y por consiguiente favoreciendo la infección por parte de la bacteria.

Específicamente, se ha observado que *Pseudomonas* induce la activación del cierre estomático en la planta. Para evadir esta respuesta inmune, la bacteria ha evolucionado produciendo factores de virulencia específicos, entre los que se encuentra la coronatina (análogo funcional del JA), que producen la reapertura estomática. De este modo, en este tipo de interacciones el JA se ha propuesto como un regulador negativo de la defensa estomática, mientras que el SA se presenta como un regulador positivo, de la misma (Melotto *et al.*, 2008, 2017; **Figura 3**).

Por lo tanto, existe una fina regulación de las moléculas del metabolismo secundario que participan en la señalización de la respuesta defensiva.

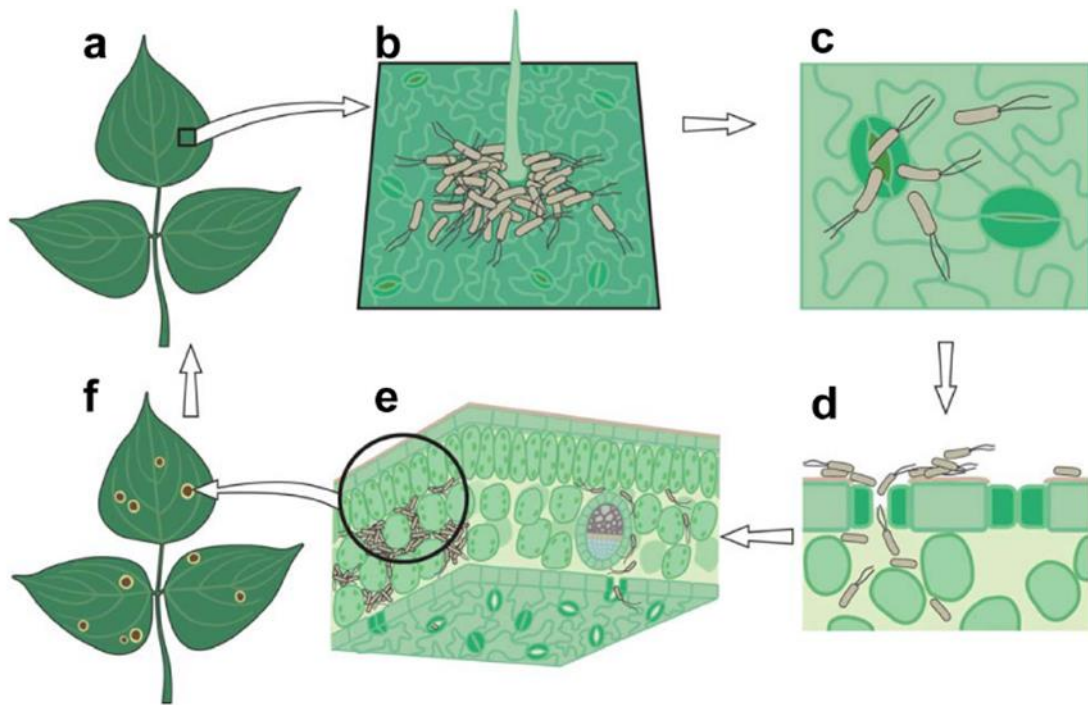


Figura 4. Diagrama del ciclo de infección de *Pseudomonas syringae*. En las hojas de una planta sana (a) las bacterias se agrupan cerca de tricomas (b), una vez formada la agregación, las bacterias penetran a través del estoma abierto (c y d) para colonizar el apoplasto de la planta. Una vez aquí ya comienza la multiplicación de las bacterias (e), causando diferentes síntomas visibles, como pueden ser necrosis y clorosis (f) (Melotto *et al.*, 2008).

2. EL METABOLISMO SECUNDARIO EN EL SISTEMA DEFENSIVO DE LAS PLANTAS

Las plantas, de manera general, producen una gran cantidad de compuestos orgánicos, que se clasifican en metabolitos primarios y secundarios en función de si son o no esenciales para éstas. Los metabolitos primarios son los productos del metabolismo que intervienen de forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas, siendo además comunes en todas las especies pertenecientes al reino Plantae.

Por el contrario, los metabolitos secundarios se han considerado no esenciales debido a que su ausencia en el organismo no compromete su viabilidad. Estos compuestos varían ampliamente entre las especies de plantas e intervienen en las relaciones que las plantas tienen con su ambiente, presentando desde propiedades biológicas de tipo antibiótico, insecticida o herbicida, hasta capacidad para atraer animales que favorezcan su polinización y dispersión. Así pues, juegan un papel muy importante en la protección de la planta frente a ataques patogénicos (Buchanan *et al.*, 2002).

Atendiendo a sus orígenes biosintéticos, pueden establecerse tres grandes grupos de compuestos que conforman el metabolismo secundario de las plantas: terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides (Korkina, 2007). De los tres grupos, nos centraremos en los dos primeros por su relación con la línea de investigación del presente Trabajo Fin de Máster.

2.1 Terpenos

Los terpenos, también conocidos con el nombre de terpenoides o isoprenoides, forman un conjunto enormemente variado de metabolitos secundarios (más de 40.000) descritos tanto en plantas, como en animales y microorganismos (Roberts, 2007). Varios de estos compuestos poseen un papel importante en la defensa de las plantas frente estreses bióticos y abióticos; o son utilizados por las plantas como moléculas señal para atraer a los insectos polinizadores. Algunos terpenoides tienen funciones directas en las estrategias defensivas de las plantas, acumulándose frente a una infección patogénica y actuando como fitoalexinas. Un ejemplo de ello es el capsidiol, un sesquiterpeno que se acumula de manera característica en Solanáceas como respuesta ante una infección de tipo bacteriana y fúngica, ya que inhibe el crecimiento de esta clase de patógenos.

Todos los terpenos derivan del 2-metil-1,3-butadieno o isopreno y se caracterizan por contener un número de carbonos múltiplo de 5. Esta característica se toma como base para clasificarlos en función de su estructura. Por ello diferenciamos: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) y politerpenos ($>C_{40}$).

Por sus propiedades físico-químicas, los terpenos menores de 30 C se consideran compuestos orgánicos volátiles (VOCs; *Volatile Organic Compounds*). Como tales, son capaces de atravesar las membranas celulares y ser liberados a la atmósfera. Son emitidos por casi cualquier tipo de tejido y tipo de planta (árboles, arbustos, pastos,...) de manera constitutiva o en respuesta a una gran variedad de estímulos.

○ Biosíntesis de los terpenos

El primer paso en la ruta biosintética de terpenos es la generación de los precursores de 5 carbonos (C_5): el isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero alilo más reactivo el dimetilalil pirofosfato (DMAPP). En plantas, ambos precursores pueden ser generados por dos rutas compartimentadas y diferentes: (i) la ruta del ácido mevalónico (MVA), la cual se producen en citosol, retículo

endoplasmático y peroxisomas (Carrie *et al.*, 2007; Markus Lange y Ahkami, 2013) y (ii) la ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), que se lleva a cabo en los plastos (Hsieh *et al.*, 2008). Los monoterpenos y diterpenos se forman generalmente en los plástidos, mientras que la biosíntesis de los sesquiterpenos y triterpenos está restringida al citosol.

El IPP y el DMAPP se condensan en una orientación cabeza-cola (*head-to-tail orientation*) para formar difosfatos de prenilo C₁₀, C₁₅ y C₂₀. El DMAPP requerido deriva del IPP mediante la acción de la IPP isomerasa, que también es capaz de catalizar la reacción inversa. Las enzimas conocidas como preniltransferasas añaden un número variable de unidades de IPP a un cebador de DMAPP para alargar las cadenas de carbonos. El resultado es la síntesis de los precursores de los diferentes tipos de terpenos, a saber: geranyl difosfato (GPP), precursor de los monoterpenos, farnesil difosfato (FPP), de los sesquiterpenos y geranylgeranyl difosfato (GGPP), que dará lugar a los diterpenos. Las preniltransferasas son importantes enzimas reguladoras ya que están situadas en los puntos de ramificación primaria de la vía biosintética de terpenos, dirigiendo el flujo entre las diferentes clases principales de terpenoides (Ashour *et al.*, 2010; Wink, 2010; Singh y Sharma, 2015).

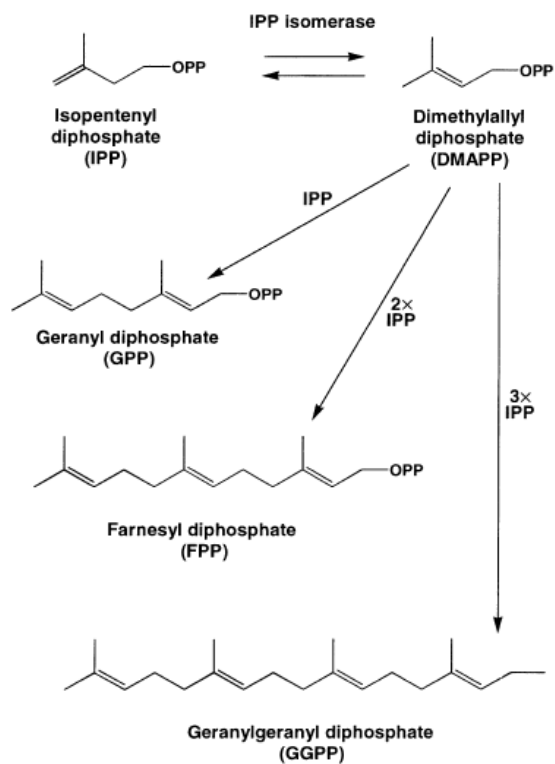


Figura 5. Formación de los precursores terpenoides. La unión de unidades de DMAPP y IPP conllevan a la creación de los difosfatos de prenilo C₁₀, C₁₅ y C₂₀ (Wink, 2010).

Las terpeno sintasas, también conocidas como terpeno ciclasas debido a que la mayoría de sus productos son cíclicos, utilizan un mecanismo de reacción carbocatiónico muy similar al empleado por las preniltransferasas. La ciclación está seguida de una serie de reordenamientos que terminan en la desprotonación del catión a una olefina o en su captación por parte de un nucleófilo, como puede ser el agua.

Es probable que las terpeno sintasas sirvan como agentes importantes de control de flujo en la biosíntesis de terpenos porque operan en puntos de ramificación del metabolismo donde las vías divergen hacia diferentes tipos de terpenos. Un ejemplo de ello es el que muestran las investigaciones de Chris C. N. van Schie y colaboradores (2007) en las que describen por primera vez dos monoterpeno sintasas de tomate: LeMTS1 y LeMTS2. A pesar de su gran homología de secuencia, mientras que la proteína recombinante LeMTS1 produce (R)-linalool a partir de GPP y (E)-nerolidol a partir de FPP; la proteína recombinante LeMTS2 produce β -felandreno, β -mirceno y sabineno a partir de GPP. Asimismo, demuestran que ambos genes se expresan en diferentes tejidos. Por otra parte, *MTS1* se induce no sólo por ácido jasmónico (JA) en los tricomas, sino también por heridas y por el ataque de herbívoros. Por último, estos autores observaron que la sobreexpresión de *MTS1* produce el aumento de los niveles de linalool, indicando que se trata de una linalol sintasa (Van Schie *et al.*, 2007).

○ Terpenos en la interacción planta-patógeno

La liberación de compuestos volátiles por las plantas tiene un papel fundamental en la relación de éstas con su entorno. La función de estos compuestos puede ser directa, si los VOCs emitidos tienen un papel defensivo por sí mismos, o indirecta, si por el contrario actúan como elicitores, tanto en la planta productora como en las que se encuentran a su alrededor, induciendo mecanismos que activarán o reforzarán sus defensas (Niinemets *et al.*, 2013).

Aunque la mayoría de los estudios se centran en los VOCs asociados a la respuesta defensiva de la planta frente a herbívoros, cada vez son más aquéllos que demuestran tanto la emisión como la funcionalidad de los volátiles frente a diferentes patógenos, como bacterias, hongos o virus (Huang *et al.*, 2003, 2005; Park *et al.*, 2007).

La señalización entre plantas o en inglés *interplant communication* se considera una señalización de respuesta a estrés de una planta a otra planta vecina. Por su naturaleza sésil, las plantas requieren de algún tipo de mecanismo para transmitir los cambios que se producen en el

ambiente que las rodea, lo que incluye cualquier tipo de ataque patogénico. Mediante este *interplant communication* una única planta que ha sido infectada puede, a través de los VOCs, enviar una señal de alerta a las plantas colindantes, con el fin de activar en ellas mecanismos de defensa previos a la posible infección (Park *et al.*, 2007; Pickett y Khan, 2016; Riedlmeier *et al.*, 2017).

En nuestro laboratorio se realizó, mediante cromatografía gaseosa (GC) acoplada a la espectrometría de masas (MS), un análisis metabolómico diferencial dirigido a VOCs de la respuesta defensiva de hojas de plantas de tomate 'Rio Grande' *Pto* infectadas con dos cepas de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 portadoras o no del gen *AvrPto*. La comparación de ambos perfiles metabolómicos reveló una serie de compuestos cuya acumulación difería entre las dos infecciones. Cuando la infección es avirulenta y, por lo tanto, tiene lugar la activación de la ETI, la planta emite de manera diferencial ésteres derivados del (Z)-3-hexenol y algunos monoterpenos hidroxilados, como el α -terpineol, 4-terpineol y el linalool (López-Gresa *et al.*, 2017).

Asimismo, se comprobó que algunos de esos VOCs diferencialmente emitidos tras infecciones de *P. syringae*, tales como el α -terpineol y el butanoato de (Z)-3-hexenilo, podían actuar como metabolitos defensivos ya que su aplicación exógena inducía en la planta la expresión de genes implicados en la respuesta defensiva frente a patógenos (Kabbas, 2015; Lisón *et al.*, 2017; Ozáez, 2017).

2.2 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo asombrosamente numeroso y muy variable en lo que a estructura y función biológica se refiere (Beggs *et al.*, 1987; Christie *et al.*, 1994; Dixon y Paiva, 1995). A pesar de ser muy diferentes entre ellos, comparten características en común, tales como su origen, ya que todos proceden de la ruta del siquimato-corismato; o la presencia de anillos aromáticos en su estructura.

El ácido siquímico, que se obtiene a partir del fosfoenolpiruvato y la eritrosa 4-fosfato, da lugar al ácido corísmico, el cual, a su vez es precursor de diferentes compuestos fenólicos y de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (Weber *et al.*, 1997). A su vez, a partir del aminoácido fenilalanina, se sintetiza el ácido cinámico precursor del ácido benzoico y del

ácido cumárico. A partir de éstos se inicia la síntesis tanto de los compuestos fenólicos simples como de los más complejos como son los fenilpropanoides, los flavonoides, los taninos y los lignanos. Una de las funciones biológicas de interés de los compuestos fenólicos es su implicación directa o indirecta en la respuesta defensiva de las plantas.

De entre todos estos compuestos fenólicos, este TFM se va a centrar en el estudio del papel que juegan el ácido salicílico (SA) y el ácido gentísico (GA), dos compuestos fenólicos simples derivados del ácido benzoico, en la señalización de la respuesta defensiva de la planta.

2.2.1 Ácido Salicílico

El ácido salicílico (SA) es un compuesto fenólico presente en un gran número de plantas que está implicado en gran cantidad de procesos fisiológicos y bioquímicos, siendo la activación de programas de defensa inducibles su función mejor caracterizada (Alvarez, 2000). El SA desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta hipersensible (HR) y de la respuesta sistémica adquirida (SAR), su incremento en los niveles endógenos y de sus derivados glicosilados en plantas infectadas, coincide con la activación de genes que codifican proteínas defensivas PRs y con el establecimiento de la resistencia en la planta (Ryals *et al.*, 1996; Shah, 2003).

○ Metabolismo del SA

El SA o ácido 2-hidroxibenzoico se sintetiza en la planta a partir de la fenilalanina a través de la ruta de los fenilpropanoides en el cloroplasto, o también en el citosol, por de la ruta biosintética del isocorismato, siendo ésta la principal fuente de SA cuando la planta se enfrenta a una infección patógena y se establece la SAR (Wildermuth *et al.*, 2001).

Estas dos vías enzimáticas parten de un mismo metabolito, el corismato, que es el producto final de la ruta del siquimato anteriormente mencionada.

Debido a sus efectos citotóxicos, la mayor parte del SA presente en la planta se conjuga con glucosa (SA-O- β -glucósido) y se almacena en la vacuola. Este conjugado constituye una reserva de SA inactiva que puede liberarse lentamente en su forma activa cuando la planta lo necesite por la acción de glucosil-hidrolasas (Dean *et al.*, 2005; Canet *et al.*, 2010).

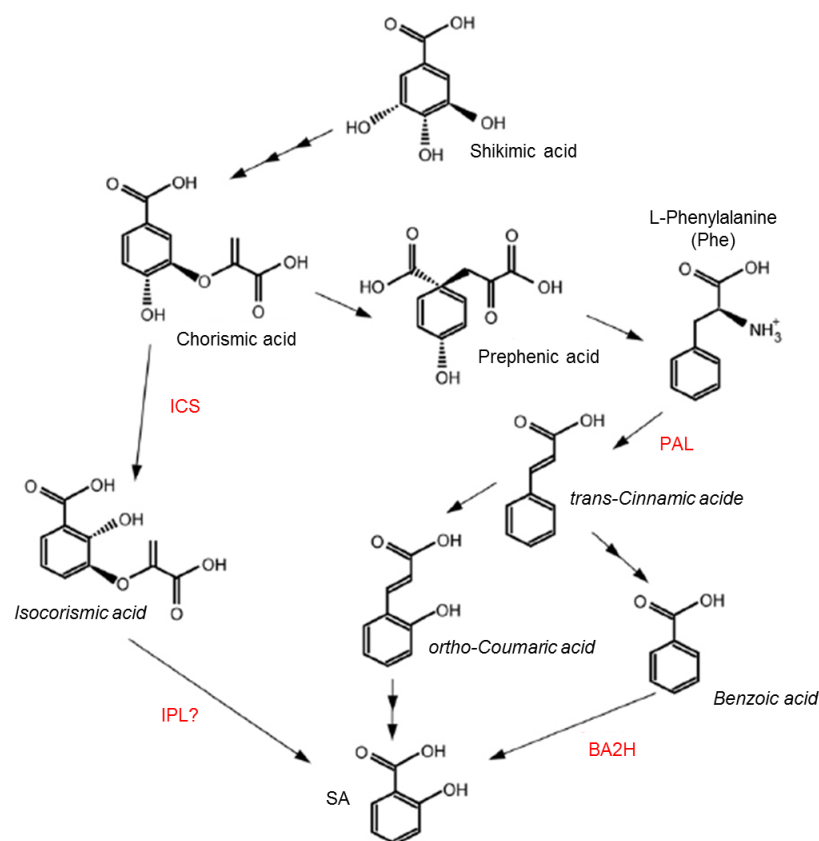


Figura 6. Biosíntesis y metabolismo del SA en plantas. En plantas existen dos vías de síntesis de ácido salicílico (SA), a partir del metabolito primario corismato: (1) la vía isocorismato, que requiere de las enzimas ICS (isocorismato sintasa) e IPL (isocorismato piruvato liasa); y (2) la ruta a partir de la fenilalanina, a través de una serie de reacciones enzimáticas catalizadas por la enzima PAL (fenilalanina amonio liasa) (adaptada de Miura y Tada, 2014).

Además de esto, el SA puede sufrir diferentes modificaciones que le proporcionan respuestas defensivas específicas, ya que éste puede conjugarse con aminoácidos o metilarse para formar metil-salicilato (MeSA), siendo este último el descrito como la molécula que se moviliza para activar la SAR en tabaco (Nobuta *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007).

Aunque todavía hay mucho que averiguar sobre el catabolismo del SA, las recientes investigaciones en *Arabidopsis* que han demostrado la existencia de que la enzima salicilato 3-hidroxilasa (S3H), la cual se encuentra inducida por SA, convierte a este compuesto en ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHBA; GA) y 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) *in vitro* y en 2,3-DHBA *in vivo*. Estos dos compuestos son las formas desactivadas de SA, cuya principal función es la de impedir que se sobreacumule SA (Bartsch *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013).

○ El SA como molécula señal

El SA juega un papel muy importante como activador y regulador de respuestas defensivas en interacciones tanto de tipo compatible como incompatible, además de que es necesario para desarrollar los síntomas de la enfermedad (O'Donnell *et al.*, 2003).

El incremento de los niveles endógenos de SA y sus conjugados con glúcidos en plantas infectadas está relacionado con la activación de genes que codifican proteínas PR y el establecimiento de la resistencia de la planta (Delaney *et al.*, 1994). Aplicaciones exógenas de la hormona o de alguno de sus análogos funcionales, promueven en la planta dos fases de expresión génica. En la primera fase, que ocurre a las 2 o 3 horas después del tratamiento, se expresan enzimas detoxificantes (glutación-S-transferasas, glicosiltransferasas, etc.), que ayudan a proteger a las células del estrés oxidativo (Horvath y Chua, 1996). En la segunda fase, se produce la activación de genes codificantes de proteínas de defensa, entre las que destacan las proteínas PR; esta fase tiene lugar entre las 12 y las 16 horas tras la aplicación del SA (Sticher *et al.*, 1997; Uquillas *et al.*, 2004). Esta aplicación exógena de SA hace más resistente a la planta frente a un ataque patogénico (Meher *et al.*, 2011; Wang y Liu, 2012). Además, la expresión del gen de defensa *PR1* (*PATHOGENESIS-RELATED1*) se emplea como marcador clásico de la respuesta a SA y de la activación de la respuesta defensiva de la planta (Tornero *et al.*, 1993; van Loon *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2014).

Por otra parte, el compuesto volátil derivado de la metilación del SA, el metil-salicilato (MeSA), posee un papel muy importante como molécula señal en la inducción de la SAR en la planta, junto con otros volátiles (Bartsch *et al.*, 2010).

2.2.2 Ácido Gentísico

El ácido 2,5-hidroxibenzoico o ácido gentísico (GA) es un compuesto fenólico producto de la hidroxilación del ácido salicílico en el carbono 5. Esta reacción ha sido descrita tanto en tejidos animales (Lutwak-Mann, 1943) como en microorganismos (Walker y Evans, 1952) y plantas (Ibrahim y Towers, 1959).

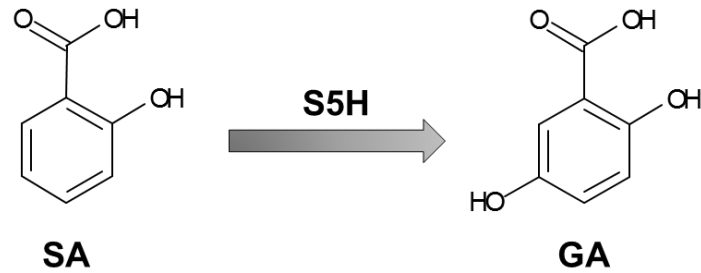


Figura 7. Reacción de hidroxilación en el C5 del SA por la salicilato 5-hidroxilasa. El ácido salicílico (SA) se hidroxila en el carbono 5 para dar lugar a ácido gálico (GA).

En nuestro laboratorio, el GA se identificó cuando se llevaba a cabo un estudio comparativo de la acumulación de compuestos fenólicos de la planta ante una interacción de tipo compatible, entre plantas de tomate control e infectadas con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd). Los resultados obtenidos mostraban que las hojas de aquellas plantas infectadas acumulaban una gran cantidad de GA, incluso mayor que la de SA (Bellés *et al.*, 1999). En el laboratorio también se comprobó que las acumulaciones de GA no eran exclusivas de plantas de tomate, sino que también se producían en *Cucumis sativus* (pepino) o *Gynura aurantiaca* como consecuencia de infecciones no necrotizantes (Bellés *et al.*, 2006). Estos datos se corroboraron posteriormente con un estudio metabolómico mediante resonancia magnética nuclear (RMN) en el que se analizaron los cambios metabolómicos globales implicados en la interacción tomate-CEVd. Con este análisis se identificaron los diferentes metabolitos implicados en la respuesta sistémica que desarrollaba la planta y el GA resultó ser el que más fuertemente se inducía (López-Gresa *et al.*, 2010).

Otros trabajos de nuestro laboratorio describen la inducción de proteínas PRs (en concreto P23, P32 y P34) en plantas de tomate que han sido tratadas con GA de manera exógena y que son diferentes de las que se inducen ante los tratamientos por SA (Bellés *et al.*, 1999). Asimismo, la aplicación exógena tanto de SA como de GA, promueven además de esta acumulación de PRs, la activación de peroxidasas (Bellés *et al.*, 2006) y de mecanismos de silenciamiento génico, lo que se traduce en una mayor resistencia de la planta ante patógenos de RNA (Campos *et al.*, 2014).

Los altos niveles observados de GA en diferentes interacciones planta-patógeno de tipo compatible, así como su capacidad para promover varias respuestas defensivas en la planta, como son la inducción de PRs y mecanismos de silenciamiento génico, parecen revelar el posible papel del GA como una molécula señal adicional y complementaria al SA en lo que a la activación de la respuesta defensiva se refiere.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la biosíntesis del GA, en nuestro laboratorio se llevó a cabo la búsqueda del gen ortólogo *S3H* de *Arabidopsis thaliana* en tomate, para ver si presentaba actividad salicilato 5-hidroxilasa (S5H) y era el responsable de la conversión de SA a GA en las infecciones provocadas por viroide y bacteria. Los resultados obtenidos correlacionaron la acumulación de esta proteína ortóloga a S3H, propuesta como SIS5H, con la acumulación de GA en todas las muestras infectadas (Camps, 2014). Además, también se comprobó la actividad de la proteína S5H *in vivo* mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Con ello se detectó que las plantas agroinoculadas con la construcción que portaba el gen clonado de S5H e incubadas con SA, presentaban una reducción significativa en la cantidad de SA libre y total con respecto a las plantas control (agroinoculadas con el vector vacío), confirmando que esta enzima está implicada en el catabolismo de SA (Hernández, 2015).

Parece ser que con el tiempo el llamado *metabolismo secundario* de las plantas ha ido adquiriendo la importancia que merece, al pasar de ser un conjunto de procesos biológicamente insignificantes debido a que englobaba moléculas que al parecer no eran esenciales, a estar implicado en multitud de procesos, que si bien no tienen la importancia del *metabolismo primario*, son vitales para la supervivencia de las plantas. En este contexto podemos destacar numerosos metabolitos secundarios de gran valor en las interacciones planta-patógeno, tanto en señalización como de respuesta, como son los terpenos y los metabolitos de naturaleza fenólica, recogidos en el presente Trabajo de Fin de Máster.

II OBJETIVOS

I. Estudio de la posible función defensiva de los VOCs producidos por la monoterpene sintasa 1 (MTS1) en plantas de tomate en la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

II. Estudio del papel de los monoterpenos en la comunicación entre plantas.

III. Estudio de la actividad *in vivo* y del papel defensivo de S5H, mediante el análisis de su patrón de expresión en diferentes infecciones patogénicas y la caracterización fenotípica y molecular de plantas transgénicas *RNAi_S5H*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para los estudios realizados en el presente Trabajo de Fin de Máster se emplearon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad MoneyMaker (MM), así como plantas modificadas genéticamente obtenidas en el mismo fondo genético MM.

Por un lado, se utilizaron plantas que sobreexpresan el gen monoterpene sintasa 1 de tomate (*MonoTerpene Synthase 1; LeMTS1*), bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S), así como plantas que habían sufrido el mismo proceso de transgénesis con la construcción vacía, es decir, el plásmido sin ningún gen (*pGreen*), las cuales ejercían el papel de plantas control. Ambas líneas se emplearon para estudiar el papel fisiológico de los diferentes VOCs que la planta de tomate es capaz de liberar tras un proceso infeccioso. Las semillas fueron amablemente cedidas por el Dr. Chris C. N. van Schie del *Swammerdam Institute for Life Sciences* de la Universidad de Amsterdam (Van Schie *et al.*, 2007).

Para la identificación de la proteína implicada en la degradación del SA, la salicilato-5-hidroxilasa, se utilizaron plantas que tenían suprimida la expresión del gen *S5H* mediante la tecnología de RNA antisentido, que habían sido generadas previamente en nuestro laboratorio. Se emplearon 3 líneas independientes y además plantas de la variedad MoneyMaker como controles.

1.1 Germinación de semillas

La germinación de las semillas se llevó a cabo mediante técnicas de cultivo *in vitro* en condiciones de total esterilidad. En primer lugar las semillas (separadas por líneas) se envolvieron en papel Miracloth y se cerraron con hilo. Una vez hechos los saquitos de semillas se procedió a su desinfección mediante series de agua. En primer lugar se sumergieron durante 30 minutos en un bote con lejía al 50% con 3-4 gotas de detergente Tween 20 para romper la tensión superficial del agua. Una vez finalizado el tiempo, las semillas se pasaron por 3 botes con agua destilada autoclavada durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente, con el objetivo de eliminar progresivamente los restos de lejía. Una vez las semillas fueron esterilizadas, se sembraron en botes autoclavados de 0,5L con 55 mL de medio de germinación (**Tabla 1**), el cual varía

dependiendo de si las semillas son las utilizadas como control o por el contrario son transgénicas, en cuyo caso se suplementa con un antibiótico para seleccionarlas, en este caso kanamicina. Todo este proceso se realizó en cabina de flujo laminar manteniendo las condiciones de esterilidad.

Tabla 1. Composición y preparación de 1L de medio de germinación.

Compuesto	Cantidad (1 L)
Medio MS (Murashige & Skoog)	4,4 g
Sacarosa	10 g
H ₂ O destilada	Hasta 1 L
Ajuste pH=5.7	
Agar	8 g
AUTOCLAVAR (121 °C, 15 min)	
Kanamicina (100 mg/mL)	1 mL

1.2 Condiciones de cultivo

Una vez sembradas las semillas, los botes se cerraron con cinta Micropore™ que permite un intercambio de gases sin llegar a contaminar el medio. Todos los botes permanecieron en completa oscuridad durante 48-72 horas a 24 °C y pasado ese tiempo se descubrieron y permanecieron en las cámaras de cultivo *in vitro*, con unas condiciones de 23 °C (día y noche), fotoperiodo de 8:00 a 00:00 (16 h de luz; referencia de las lámparas SYLVANIA GRO-LUX F58W/GRO-T8) hasta que se desarrollaron los cotiledones, esto es unas 3 semanas aproximadamente.

Una vez desarrollados los cotiledones las plántulas fueron sometidas a aclimatación en condiciones de invernadero, con una temperatura entre los 20-26 °C, una humedad relativa de entre el 50 y el 70% y con un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). Tras eliminar los restos de medio de germinación que pudiese quedar en las raíces, las plántulas se pasaban a macetas individuales (12 cm de profundidad por 13 cm de diámetro inferior) con mezcla de turba y perlita al 50%; y por último se cubrían con un vaso de plástico transparente para facilitar su acondicionamiento. Las macetas se regaban de manera habitual y manual con solución nutritiva de Hoagland.

Para los estudios de senescencia de las transgénicas *Sl_RNAi_S5H* debido al tamaño que las plantas adquieren a partir de la cuarta semana tras cultivarlas en maceta, se procede a un trasplante a macetas de un calibre mayor, de unos 30 cm de diámetro aproximadamente.

2. MATERIAL MICROBIOLÓGICO Y PROCESO DE INFECCIÓN

La bacteria empleada para infectar las plantas de tomate fue cedida amablemente por la Dra. Selena Giménez del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid). Dicha bacteria pertenece a la especie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, con la particularidad de que se trata de una cepa virulenta ya que tiene delecionado el gen de avirulencia *AvrPto* (*Pst* Δ *AvrPto*), por lo que la planta es incapaz de reconocerla a pesar de poseer el gen de resistencia *Pto*. El resultado de la infección con esta bacteria es una interacción de tipo compatible que desemboca en el desarrollo de la enfermedad.

Las plantas de tomate fueron infectadas con la cepa bacteriana *Pst* Δ *AvrPto*, una vez que presentaban la tercera y cuarta hojas verdaderas lo suficientemente desarrolladas, es decir, en torno a los 21-30 días del pase a maceta.

Los medios de cultivo empleados para llevar a cabo las infecciones y el conteo bacteriano fueron los siguientes:

Tabla 2. Composición y preparación de 1L de medio de cultivo bacteriano LB agar.

Compuesto	Cantidad (1 L)
LB agar (Pronadisa)	35 g
H ₂ O destilada	Hasta 1 L
AUTOCLAVAR (121 °C, 15 min)	
Kanamicina (100 mg/mL)	1 mL
Rifampicina (10 mg/mL)	10 mL
Espectinomina (10 mg/mL)	2,5 mL

Tabla 3. Composición y preparación de 1L de medio de cultivo bacteriano King B líquido.

Compuesto	Cantidad (1 L)
Proteosa peptona	10 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
Glicerol	15 g
H ₂ O destilada	Hasta 1 L
AUTOCLAVAR (121 °C, 15 min)	
MgSO ₄	5 mL
Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL

2.1 Preparación del inóculo bacteriano

La bacteria, previamente almacenada en glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, fue estriada en placas Petri de 9 cm de diámetro que contenían 25 mL de medio LB agar (Pronadisa) con los antibióticos indicados en la **Tabla 2**, y crecida en oscuridad durante 48 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tras observar el crecimiento de colonias, éstas se recogieron con puntas de pipeta y se sembraron en 3 mL de medio King B líquido (**Tabla 3**) en tubos Falcon de 50 mL. El cultivo bacteriano se creció en agitación a 200-220 rpm a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de 24 h en agitación, se pasó 1 mL del cultivo a otro tubo Falcon nuevo con 14 mL del mismo medio (King B líquido) y se dejó crecer en las mismas condiciones que las descritas en el paso anterior.

El cultivo bacteriano resultante se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm y el sedimento total de cada tubo Falcon fue resuspendido en 20 mL de MgCl_2 10 mM estéril. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm de una dilución 1:10, a partir de la cual se calculó el volumen de cultivo bacteriano y MgCl_2 10 mM necesarios para obtener un inóculo final de densidad óptica de 0,1 a 600 (D.O) que corresponde aproximadamente a 1×10^7 unidades formadoras de colonia por mililitro (Cfu/mL; López-Gresa, 2017).

2.2 Infección bacteriana

La infección se llevó a cabo por inmersión, sumergiendo la parte aérea de las plantas en una disolución de MgCl_2 10 mM con 0,05% de Silwet y cultivo bacteriano a una D.O. de 0,1 durante 30 segundos. Las plantas denominadas como *mock* fueron igualmente sumergidas en una solución estéril de MgCl_2 10 mM al 0,05% de Silwet, aunque sin inóculo bacteriano (protocolo adaptado de Scalschi *et al.*, 2013). De este modo, al tratar plantas infectadas o no con la misma solución en la que se encuentra la bacteria, nos aseguramos de que los síntomas son debidos a esta última y no a los daños producidos por la inmersión.

3. TOMA DE MUESTRA

Los folíolos utilizados en cada uno de los experimentos se obtuvieron de la 3ª y 4ª hoja de cada planta de tomate. Para diferenciar los 5 folíolos verdaderos que poseen las hojas jóvenes de tomate se estableció la nomenclatura indicada en la **figura 8**.

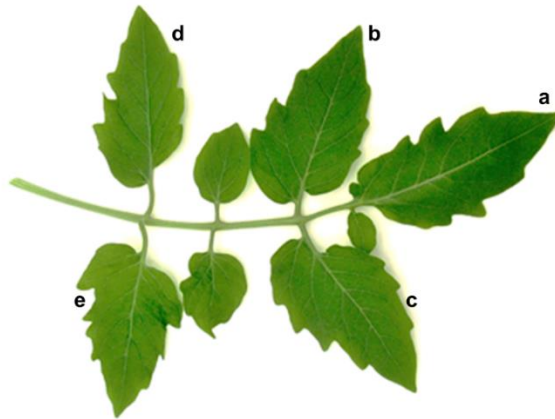


Figura 8. Representación de una hoja de tomate. Debido a las características de las hojas de tomate se asignó a cada foliolo una letra para diferenciarlos, siendo (a) el foliolo que se encuentra en el extremo, más distal al tallo, (b) y (c) los siguientes y que se encuentran entre (a) y (d) y (e), siendo estos dos últimos los más cercanos al tallo.

Cada foliolo o pareja de folíolos fueron empleados para un experimento determinado. Para el análisis de apertura estomática siempre se recogió el foliolo 'a'. En el caso de los experimentos de conteo bacteriano y conductividad se tomaron los folíolos 'b' y 'c' de la zona intermedia. El material vegetal utilizado en estos tres experimentos descritos se recogió en fresco y se continuó cada experimento independientemente. Por último, para los estudios de análisis de expresión génica y para el análisis de volátiles por GC-MS los folíolos empleados fueron 'a' (en el caso de que no se utilizase previamente en apertura estomática), 'd' y 'e'. En ese caso, se recogieron en frascos de 20 mL (DELTALAB S.L) empleando en todo momento nitrógeno líquido. Seguidamente, fueron trituradas en el homogeneizador *TissueLyser II* (Qiagen), en frío para evitar la degradación de la muestra. Una vez realizado dicho proceso, las muestras homogeneizadas y congeladas se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso.

4. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

4.1 Conteo bacteriano en hoja de tomate

Esta técnica consiste en realizar un recuento de las unidades formadoras de colonias (Cfu; *Colony forming unities*) presentes en el material vegetal infectado.

Con la ayuda de un sacabocados se tomaron 3 discos de 1 cm² de los folíolos 'b' y 'c' de cada una de las plantas y se sumergieron en tubos Eppendorf de 2 mL que contenían 300 µL de MgCl₂ 10 mM, de forma que cada tubo correspondía a una planta. Estos discos se trituraron en el homogeneizador *TissueLyser II* (Qiagen), añadiendo previamente a cada tubo perlas de vidrio. A continuación, en cabina de flujo laminar se añadieron otros 700 µL de MgCl₂

10 mM, obteniendo 1 mL final. La mezcla se agitó con vórtex hasta su completa homogeneización y se realizaron diluciones seriadas 1:10.

Una vez acabadas las diluciones, se sembraron placas Petri de 9 cm de diámetro que poseían medio de cultivo King B agar (**Tabla 4**) con 100 µL de 4 diluciones seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) y se extendieron con la ayuda de pequeñas esferas de vidrio. Las placas se incubaron a 28 °C durante un periodo 48 h, tras el cual se llevó a cabo el recuento de colonias aisladas formadas con la ayuda de un contador de colonias (Selecta; Vidrafoc).

Tabla 4. Composición y preparación de 1L de medio de cultivo bacteriano King B agar.

Compuesto	Cantidad (1 L)
King B agar (King B Medium Pseudomonas F Agar USP) (Pronadisa)	37 g
Glicerol	15 g
H ₂ O destilada	Hasta 1 L
AUTOCLAVAR (121 °C, 15 min)	
Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL

Con la ayuda de una hoja de cálculo se determinó el número de unidades formadoras de colonias (Cfu) por cm² de tejido foliar, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{Cfu}{cm^2} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times 10 \times 10^{\text{dilución}}}{n^{\circ} \text{ de discos tejido vegetal}}$$

4.2 Medidas de conductividad por fuga de electrolitos

Esta técnica consiste en cuantificar la diferencia de conductividad entre el material infectado y no infectado, como medida del daño que causa la infección sobre la planta.

Se tomaron 5 discos de 1 cm² de los folíolos 'b' y 'c' de cada planta con la ayuda de un sacabocados y se sumergieron en tubos Falcon de 50 mL que contenían 10 mL de agua mili-Q (2 mL/disco), de forma que cada tubo correspondía a una planta. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en agitación (175 rpm), decantando el agua de los tubos y rellenándolos con 10 mL de agua mili-Q en cada uno de los 3 lavados. Al transcurrir ese tiempo, se midió la conductividad de cada muestra utilizando un conductímetro portátil 4120410 (Selecta). Con el fin de obtener la conductividad máxima, se hirvieron los tubos durante una hora en un baño de perlas de vidrio a

100 °C. Una vez finalizado este proceso, las muestras se dejan atemperar y una vez alcanzada la temperatura ambiente (25 °C aprox.) se vuelve a medir la conductividad de cada muestra. La conductividad se representa como porcentaje, tomando como 100% la conductividad de las muestras hervidas.

5. ESTUDIOS DE COMUNICACIÓN ENTRE PLANTAS

Para estudiar el papel comunicativo que ejercen los VOCs en las plantas, se realizaron ensayos en entornos herméticos y controlados. Para ello, se utilizaron plantas transgénicas de la variedad MoneyMaker que sobreexpresaban o no el gen *MTS1*, denominadas *MTS1* y *pGreen*, respectivamente. Dichas plantas, de entre 21 y 30 días, permanecieron en el invernadero desde su aclimatación en maceta hasta su uso en el experimento, con las condiciones externas previamente descritas en el apartado 1 de Materiales y Métodos.

Para llevar a cabo los estudios, se colocaron 4 plantas en cámaras de metacrilato de 110 L de capacidad, que posteriormente se sellaron y precintaron con vaselina, papel film transparente y cinta adhesiva, asegurando así una atmósfera cerrada y uniforme. En cada repetición del experimento se utilizaron tres cajas: dos de ellas con 2 plantas *MTS1* y 2 plantas *pGreen*, y la tercera caja únicamente con 4 plantas *pGreen*.

6. MEDIDAS DE LA APERTURA ESTOMÁTICA

En primer lugar, se obtuvieron moldes del envés de los folíolos designados como 'a', colocando una fina capa de pegamento líquido universal, el cual se dejaba secar en torno 7-10 minutos y se despegaba cuidadosamente con la ayuda de pinzas. A partir de estos moldes, se procedió a la visualización de los estomas a través del microscopio óptico. Para mejorar la visualización, se cortaron secciones planas de cada molde que se colocaron en un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos hidratándolos con ayuda de una pipeta Pasteur para facilitar su visualización y su adhesión al portaobjetos.

La técnica microscópica de campo claro hizo posible la visualización en el microscopio de estas muestras incoloras, evitando la necesidad de cualquier tipo de tinción. De cada muestra se tomaron varias fotos (en torno a 16) que posteriormente fueron estudiadas mediante el programa de análisis de imagen *Image J*. Utilizando dicho programa se midió el ancho y el alto de los estomas visibles en los moldes, realizando mediciones en al menos 50 estomas por folíolo de cada

una de las plantas de estudio. Una vez obtenidas todas las mediciones se calculó el ratio medio de apertura estomática de cada muestra (**Figura 9**).

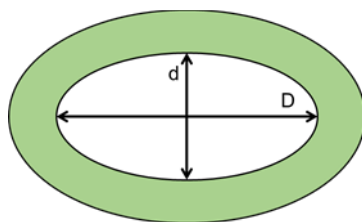


Figura 9. Representación de la medida del ancho (D) y el alto (d) de un estoma tipo.

7. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE TRANSCRITOS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)

Para llevar a cabo estos análisis, se partió del material vegetal (folíolos 'a', 'd' y 'e') previamente homogeneizado y congelado tal y como se describe en el apartado 3 de Materiales y Métodos.

7.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA de hojas de tomate se llevó a cabo mediante el método del Trizol (Trizol® Reagent; Ambion® Life Technologies) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. Para evitar la degradación del RNA, se mantuvieron las muestras en nitrógeno líquido durante todo el proceso, y todas las centrifugaciones se realizaron a 4 °C. Al finalizar la extracción, el RNA fue almacenado a -20 °C en un volumen de 35 µL de agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato).

7.2 Cuantificación de RNA

Para cuantificar el RNA extraído se empleó un espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop® ND-1000, calibrado con un blanco de agua DEPC. El cálculo de la concentración de RNA se realizó a partir de la absorbancia medida a 260 nm.

Además, el espectrofotómetro utilizado muestra dos ratios de absorbancia a distintas longitudes de onda, que dan una idea del grado de pureza del ácido nucleico y la posible presencia de contaminantes. Todos los RNAs analizados presentaron valores comprendidos entre 1,8 y 2,0 para los ratios $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, lo que indica que la calidad de la muestra es buena.

7.3 Precipitación de RNA con cloruro de litio (LiCl)

A las muestras de RNA extraído y resuspendido en 35 μL de H_2O DEPC se les añadió el volumen restante de H_2O DEPC para llegar a 200 μL , y a continuación 1 volumen (200 μL) de LiCl 6M para dejarlos en hielo al menos 3 h. Transcurrido este tiempo durante el cual se produce la precipitación del RNA, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 volumen de LiCl 3M para lavar el precipitado que se forma tras esta primera centrifugación. A continuación, se procedió a otra centrifugación igual que la anterior, tras la cual se volvió a eliminar el sobrenadante y se resuspendió la muestra en 44 μL de H_2O DEPC.

7.4 Tratamiento con DNasa

Para eliminar posibles contaminantes de DNA genómico, se realizó un tratamiento con la enzima DNasa, utilizando para ello el kit comercial TURBO DNasa (*Ambion*® Life Technologies). Para obtener un volumen de reacción de 50 μL , a los 44 μL obtenidos previamente (ver apartado 7.3) se le añadieron 5 μL de tampón de reacción (10x TURBO DNasa Buffer) y 1 μL de la enzima TURBO DNase (2 U/ μL). Tras una incubación de 30 minutos a 37 °C, se añadieron 5 μL de inactivador de DNasa (DNase Inactivation Reagent) y se incubó la mezcla 2 minutos a temperatura ambiente para detener la reacción. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm durante 2 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo.

El RNA obtenido se cuantificó utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop*® ND-1000 (apartado 7.2).

7.5 Retrotranscripción

Para obtener cDNA a partir de RNA, se utilizó el kit comercial *PrimeScript*™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) de Takara, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para un volumen de reacción de 10 μL , se empleó 1 μg de RNA, 2 μL de tampón (5x PrimeScript Buffer), 0,5 μL de oligoDT Primer 50 μM , 0,5 μL de enzima retrotranscriptasa (PrimeScript RT enzymeMix I) y H_2O DEPC hasta obtener el volumen final de 10 μL . La mezcla se incubó a 37 °C durante 15 minutos en primer lugar y a continuación unos segundos (~15 s) a 85 °C.

Finalmente las muestras se pasaron a hielo y se diluyeron en la proporción 1:10 con H_2O DEPC, obteniendo un volumen final de cDNA de 100 μL . Estas muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

7.6 Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)

Este ensayo se llevó a cabo con el reactivo de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para ello se empleó una placa de 96 pocillos *MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate* (Applied Biosystems), añadiéndose 10 µL a cada pocillo. Se realizaron 3 repeticiones técnicas de cada réplica biológica de cDNA. Se selló la placa cuidadosamente evitando dejar burbujas de aire, y se dio un spin de centrifuga antes de introducirla en el equipo de PCR cuantitativa correspondiente.

La amplificación fue monitorizada a tiempo real con el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (Life Technologies). El software empleado para analizar los resultados fue la versión 2.0.4 del mismo equipo. Como control positivo del experimento, se utilizó en todos los casos el gen que codifica para la proteína actina. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se recogen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados como cebadores en los experimentos de qRT-PCRs.

Gen	Cebador Directo	Cebador Reverso
Actina	5' CTA GGC TGG GTT CGC AGG AGA TGA TGC 3'	5' GTC TTT TTG ACC CAT ACC CAC CAT CAC AC 3'
<i>PR1</i>	5' ACT CAA GTA GTC TGG CGC AAC TCA 3'	5' AGT AAG GAC GTT GTC CGA TCG AGT 3'
<i>S5H</i>	5' GGG ATG TCC CGG AAG TAA GT 3'	5' GGC ATT GGA TGG GAT ATT CA 3'

8. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para en análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) se introdujeron 100 mg de hoja de tomate totalmente homogeneizada y congelada en un vial de vidrio de 7 mL, se añadió 1 mL de una solución de CaCl₂ saturada (~ 6 M) y 100 µL de EDTA 750 mM a pH 7.5. Se cerró el vial herméticamente y se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos. La técnica de extracción de los VOCs que se empleó fue la microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME, *Head Space Solid-Phase Microextraction*). Las muestras fueron sometidas a un periodo de incubación de 10 minutos a 50 °C y a un periodo de extracción a la misma temperatura durante

20 minutos con una fibra PDMS/DVB (Supelco, Bellefonte, PA, USA) capaz de adsorber los volátiles emitidos. La desorción de los compuestos adheridos a la fibra se llevó a cabo durante un minuto a 250 °C en modo *splitless*. La microextracción en fase sólida se realizó usando un automuestreador COMBI PAL CTC Analytics (Zwingen, Suiza). Los VOCs se analizaron usando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Santa Clara, CA, USA) acoplado a un detector de masas Agilent 5975B Inert XL de impacto electrónico (IE) con una fase estacionaria 5% fenil - 95% dimetilpolisiloxano. Las condiciones térmicas del horno fueron 40 °C durante 2 minutos, una rampa de 5 °C/min hasta 250 °C y 5 minutos a temperatura constante de 250 °C. Se utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 1,5 mL/min. La adquisición de datos se realizó a 6 *scans* por segundo en un rango m/z de 35-250. Los cromatogramas y los espectros fueron adquiridos y procesados mediante el programa Enhanced ChemStation (Agilent).

La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación entre el espectro de masas de cada compuesto con la librería NIST 2005 proporcionada por el cromatógrafo y con la ayuda de la colección de compuestos de la que dispone el servicio de Metabolómica del IBMCP. Estos compuestos usados como referencia o patrón fueron adquiridos en Sigma-Aldrich o sintetizados químicamente en el propio laboratorio de Metabolómica. La coelución (mismo tiempo de retención) y la equivalencia del espectro de masas del patrón y del compuesto de estudio confirmó su identidad.

9. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Se pesaron aproximadamente 500 mg de tejido foliar en tubos Eppendorf de 2 mL, previamente triturado y almacenado a -80 °C (ver apartado 3 de Materiales y Métodos), a los cuales se les añadió rápidamente 1,5 mL de metanol. Tras homogeneizar la mezcla en vórtex, las muestras fueron sometidas a ultrasonidos durante 10 minutos con el objetivo de finalizar la disgregación del tejido. A continuación, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos y a 4 °C. El sobrenadante obtenido se trasvasó a un tubo de vidrio de 4 mL y el sedimento se resuspendió en 500 µL de metanol sometiéndolo a otro periodo de centrifuga igual que el anterior. El nuevo sobrenadante se juntó con el anterior en el tubo de 4 mL y se separó de nuevo en dos viales de vidrio, uno para la extracción de compuestos fenólicos libres y otro para la de totales. Para finalizar, todos los viales se evaporaron hasta su secado total en corriente de N₂ seco a una temperatura de 37 °C.

9.1 Extracción de compuestos fenólicos totales

El contenido en compuestos fenólicos glicosilados se determinó mediante el uso de la enzima β -glucosidasa. La hidrólisis enzimática llevada a cabo por esta enzima promueve la eliminación del azúcar y, con ello, la recuperación del compuesto fenólico en la fase orgánica, posibilitando que pueda ser detectado de la misma forma que los fenólicos libres.

Así pues a los viales secos y correspondientes al análisis de compuestos fenólicos totales, se les añadieron 900 μ L de acetato de sodio 0,1 M a pH 4.5 y 100 μ L de β -glucosidasa (Fluka) preparada a una concentración de 1 mg/mL. Del mismo modo que a las anteriores, las muestras se dejaron en incubación a 37 °C toda la noche.

Transcurrido este tiempo se añadieron 77 μ L de ácido perclórico al 70% con el fin de detener la reacción enzimática y se realizó una extracción líquido-líquido con 2,5 mL de ciclopentano-acetato de etilo (1:1). Los compuestos fenólicos de interés, que se encuentran en la fase orgánica fueron transferidos a un vial y secados de nuevo en corriente de N_2 a 37 °C.

Las muestras secas se resuspendieron en 300 μ L de metanol y se filtraron con ayuda de una jeringa de 1 mL acoplada a un filtro de nylon de 13 mm de diámetro y 0,45 μ m de poro (Waters).

9.2 Extracción de compuestos fenólicos libres

En este caso, a los viales de 4 mL etiquetados para el análisis de compuestos fenólicos libres sólo se les añadió 1 mL de acetato de sodio (0,1 M a pH 4.5) y se incubaron durante toda la noche (12 h aproximadamente) a 37 °C.

A partir de aquí el proceso de extracción es igual al descrito en el apartado 9.1.

9.3 Análisis y cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los análisis de HPLC de los extractos fenólicos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos por Yalpani *et al.*, (1993) y Bellés *et al.*, (1999). De los 300 μ L del extracto metanólico final se trasvasaron 100 μ L a los viales destinados al análisis por HPLC (Accuform PP vial 0,7 mL, Thermo Scientific), de los cuales se inyectaron 30 μ L en una columna de fase reversa Sunfire C18 (5 μ m, 4,6 \times 150 mm; Waters, Mildford, MA) equilibrada con ácido acético al 1% (J. T. Baker).

Se aplicó un gradiente de metanol (0 a 100% en agua) durante 20 minutos, con un flujo constante de 1 mL/min. Tanto SA como GA se detectaron con un detector de fluorescencia Waters 2475, empleando una λ de excitación de 313 nm y una λ de emisión de 405 nm.

Para la cuantificación de estos compuestos se elaboraron curvas patrón con distintas muestras de concentración conocida. Se añadió a un vial una solución con SA y GA a una concentración de 0,0625 mM y se aplicaron 5, 10, 20 y 40 μ L de esta solución en la columna C18.

10. RECURSOS INFORMÁTICOS

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una prueba de *t* de Student para comparar dos tipos de muestras, utilizando las herramientas estadísticas incluidas en el programa MS Excel de la *suite* Microsoft Office. Los análisis estadísticos en los que se efectuaron comparaciones entre múltiples grupos se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA Multifactorial), utilizando el software estadístico IBM SPSS Statistics 20 (IBM). En todos los análisis, un *p-value* < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

Se usaron además diversas páginas web para llevar a cabo un rastreo de secuencias, tales como TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, www.arabidopsis.org), NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y la del Proyecto Internacional de Secuenciación de Tomate (<http://www.solgenomics.net/tomato>).

Para el diseño de cebadores específicos se utilizó el servicio online Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>). La edición de las secuencias se realizó mediante el programa informático Editseq y los alineamientos de secuencias se llevaron a cabo utilizando el programa MegAlign, ambos pertenecientes a la suite bioinformática DNASTAR Lasergene.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. IMPLICACIÓN DE MTS1 EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Antecedentes

La emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) por las plantas de tomate como consecuencia de una infección bacteriana y su posible implicación en diversos aspectos de la respuesta defensiva de las plantas, hacen de estos volátiles una diana biotecnológica para su uso como productos para la prevención de las cosechas frente a diversos estreses. Tal es el caso del butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB), compuesto que ha sido patentado por nuestro laboratorio como herramienta para la protección de cultivos, debido a su capacidad para inducir el cierre estomático (Lisón P *et al.*, UPV R-18883-2016; Ozáez, 2017).

En nuestro laboratorio se llevó a cabo un estudio metabolómico para identificar compuestos volátiles sintetizados de manera diferencial en plantas de tomate sometidas a infecciones de tipo virulento o avirulento. Entre estos compuestos, además del butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) antes mencionado, destacó la emisión diferencial de algunos monoterpenoides como el linalool y el α -terpineol en la infección de tipo avirulento (López-Gresa *et al.*, 2017).

A raíz de los resultados indicados, en el laboratorio se estudió el posible papel defensivo de dichos compuestos emitidos de manera diferencial, concluyéndose que su implicación en la defensa de la planta se debe tanto por presentar una actividad antibiótica directa, como por actuar como metabolitos defensivos indirectos, ya que su aplicación exógena inducía la expresión de genes implicados en la respuesta defensiva. Así, por ejemplo, se observó que tratamientos exógenos con α -terpineol producían el cierre estomático, la activación de las defensas y por consiguiente, el aumento de la resistencia de las plantas de tomate frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Kabbas, 2015).

Teniendo en cuenta dichos resultados, nuestra intención es investigar la implicación de estos compuestos volátiles en la activación de las defensas en las plantas vecinas. Para ello, se recurrirá a las plantas transgénicas generadas por el Dr. van Schie (Universidad de Ámsterdam) que sobreexpresan el gen que codifica la monoterpene sintasa LeMTS1 (Van Schie *et al.*, 2007). Debido a la acumulación de esta enzima, estas plantas transgénicas emiten unos niveles basales mayores de linalool, si se comparan con las plantas control transformadas con el vector vacío (*pGreen*).

En el presente TFM, pretendemos estudiar el comportamiento de las plantas transgénicas *35S:MTS1* frente a una infección bacteriana y estudiar el efecto de las mismas sobre la activación de las defensas en plantas vecinas.

1.1 Análisis de VOCs de plantas *35S:MTS1* ante una infección bacteriana

Para determinar la emisión de VOCs provocada por una infección de tipo bacteriano en las plantas transgénicas *35S:MTS1*, se llevó a cabo un análisis dirigido a varios monoterpenos y monoterpenos hidroxilados (**Figura 10.A**) mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS; ver apartado 8 de Materiales y Métodos). Las muestras analizadas correspondían a las obtenidas de plantas *35S:MTS1* y *pGreen* sometidas a una infección por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), a las 24 y 48 h post-infección, así como de las plantas que habían sido tratadas con la solución sin la bacteria (Mock).

En la **Figura 10.A** se observa que la emisión de VOCs de tipo terpenoide es mucho mayor en las plantas transgénicas *35S:MTS1* en comparación con las plantas control *pGreen*, tanto en las plantas sin infectar (Mock) como en las infectadas a las 24 y 48 h post-inoculación. Así, por ejemplo, los niveles de emisión de linalool y α -terpineol en las plantas transgénicas no infectadas son comparables con los de las plantas infectadas a las 48 h y muy superiores a los de las plantas control (*pGreen*). Estos resultados confirman la función descrita para *MTS1 in vivo* como una monoterpene sintasa, y se corresponden con los obtenidos por el Dr. van Schie, en los que los niveles basales descritos de linalool en las plantas transgénicas fueron superiores a los de las plantas transformadas con el vector vacío (Van Schie *et al.*, 2007). Asimismo, en las plantas control *pGreen* se confirma la mayor emisión de estos terpenoides como consecuencia de la infección bacteriana, previamente descrita por nuestro grupo (López-Gresa *et al.*, 2017).

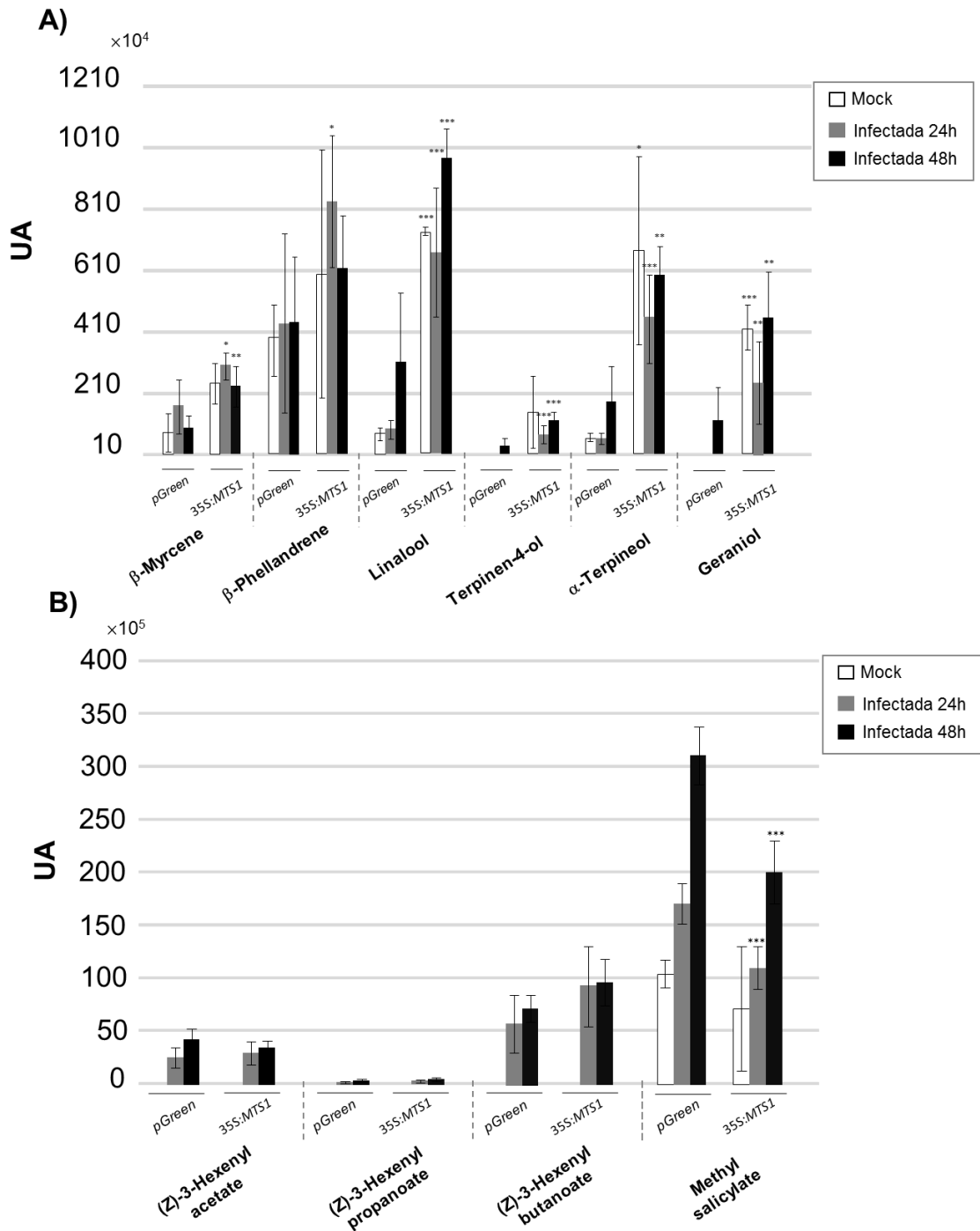


Figura 10. Emisión de VOCs de hojas de tomate MoneyMaker 35S:MTS1 y pGreen ante una infección bacteriana. Cuantificación relativa en unidades arbitrarias (UA) de los niveles de volátiles de tipo terpenoide (A) y de ésteres de GLVs y bencenoides (B) en plantas inoculadas con la solución sin la bacteria (Mock) e infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a las 24 y 48 horas post-inoculación (h). Los niveles de emisión están representados como la media \pm el error estándar de tres repeticiones de un experimento representativo. En total se realizaron tres experimentos independientes. Las diferencias significativas entre las plantas transgénicas y control se representan con un asterisco (*) cuando el p -value < 0,05, con dos asteriscos (**) cuando p -value < 0,01 y con tres asteriscos (***) cuando p -value < 0,001.

Con el fin de estudiar la posible implicación de esta monoterpene sintasa en rutas metabólicas de otros VOCs se midieron los niveles de volátiles de algunos ésteres GLVs y del bencenoide metil salicilato (MeSA). En la **Figura 10.B** se puede ver que no hay prácticamente ninguna diferencia en lo que se refiere a los niveles de los volátiles de la familia de los ésteres de GLVs. Sin embargo, el MeSA posee unos niveles basales superiores en las plantas *pGreen*. En cuanto a las plantas control *pGreen*, de nuevo se confirman los resultados descritos por López-Gresa *et al.* (2017) puesto que se observa una mayor emisión de los ésteres de GLVs en las plantas infectadas.

La síntesis de linalool está relacionada con la del ácido jasmónico (Kant *et al.*, 2004; Van Schie *et al.*, 2007). El JA y SA son dos hormonas implicadas en la interacción planta-patógeno y que además son antagonistas entre ellas (Zheng *et al.*, 2012; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2017). Esto podría estar relacionado con el hecho de que las plantas transgénicas *35S:MTS1*, que tienen unos niveles de linalool superiores a las *pGreen*, presenten unos menores niveles de emisión de MeSA. Resultaría de especial interés estudiar los niveles de JA como consecuencia de la infección bacteriana en estas plantas.

A modo de resumen podemos decir que las plantas transgénicas *35S:MTS1* presentan unos mayores niveles de emisión de compuestos terpenoides, tales como el α -terpineol y el linalool, una menor emisión de metil-salicilato y no presentan diferencias en cuanto a los niveles de emisión de los ésteres de GLVs con respecto a las plantas control *pGreen*. Puesto que el α -terpineol posee un papel defensivo frente a la bacteria *Pst* (Kabbas, 2015), sería muy interesante estudiar el comportamiento de estas plantas frente a la infección con dicha bacteria.

1.2 Estudio de la resistencia de plantas *35S:MTS1* frente a una infección bacteriana

Con el objetivo de conocer la respuesta de las plantas transgénicas *35S:MTS1* a la infección bacteriana y poder así relacionar los niveles diferenciales de VOCs con dicha respuesta, las plantas control *pGreen* y las transgénicas *35S:MTS1* se sometieron a una infección con la bacteria *Pst*. Transcurridas 24 horas tras la infección se analizó tanto el crecimiento bacteriano como el posible daño celular producido por la bacteria mediante la medida de la conductividad. Para el crecimiento bacteriano también se tomaron muestras a las 48 hpi.

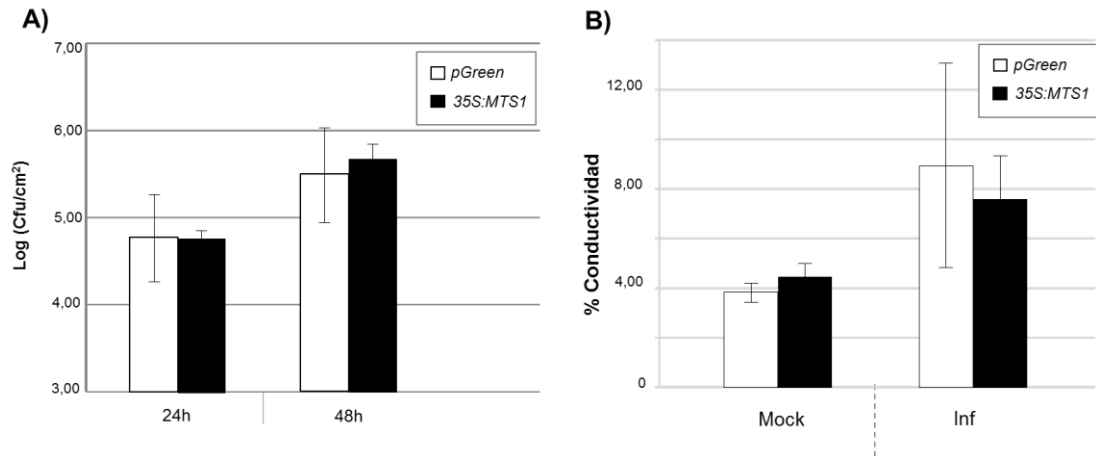


Figura 11. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (A) y muerte celular (B) de plantas de tomate *35S:MTS1* y *pGreen*. (A) Unidades formadoras de colonias (Cfu) de la bacteria en las hojas de ambos tipos de planta (transgénicas y control), a las 24 y 48 horas (h) tras la inoculación. (B) La muerte celular se midió en forma de porcentaje de la pérdida de iones en plantas no infectadas (Mock) y en plantas infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Inf). Se llevaron a cabo 5 experimentos independientes. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm el error estándar de seis plantas independientes de un experimento representativo. Se realizó un análisis de *t* de Student con los datos procedentes pero no se observaron diferencias significativas.

Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias significativas ni en la cantidad de bacteria observada entre las plantas transgénicas (*35S:MTS1*) y las plantas control (*pGreen*), ni tampoco en el daño foliar producido por la bacteria. Por lo tanto, en lo que a resistencia se refiere, parece ser que la sobreexpresión de *MTS1* no limita el avance de la bacteria.

Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que las plantas transgénicas *35S:MTS1* producen MeSA en menor cantidad que las plantas *pGreen* (Figura 10.B). Debido a que el MeSA es la forma en la que el SA se comporta como molécula señal (Nobuta *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007), su menor acumulación cuando la planta transgénica se enfrenta a la infección por *Pst* podría ser la causa de que no se observen diferencias significativas en la cantidad de bacteria medida en ambos tipos de plantas. Por lo tanto, parece que el posible papel defensivo de los terpenoides frente a la infección bacteriana se vería contrarrestado por la menor acumulación de MeSA. Además, el resto de ésteres de GLVs medidos y en los que no se aprecian cambios entre plantas *35S:MTS1* y control pueden ser también causa de esta falta de resistencia de las plantas transgénicas, ya que han sido descritos como moléculas que intervienen en la respuesta defensiva de la planta tanto de manera directa, actuando como antimicrobianos, como de manera indirecta, como por ejemplo mediante el cierre estomático (Ozáez, 2017; Payá, 2017).

La sobreexpresión de *MTS1* y por consiguiente mayor emisión de linalool, podría llevar consigo una mayor activación de la ruta mediada por JA puesto que el metabolismo de ambos compuestos está relacionado (Van Schie *et al.*, 2007). Por lo tanto, resultaría de gran interés el estudio de la posible resistencia de las plantas *35S:MTS1* frente un ataque patogénico de tipo necrótrofo o ante herbívoros (Huang *et al.*, 2017).

1.3 Estudio del efecto de plantas *35S:MTS1* sobre plantas vecinas: activación del cierre estomático

Con el fin de abordar otras funciones de los compuestos volátiles además de su implicación en la respuesta defensiva, se procedió a evaluar su importancia como moléculas señalizadoras que llevan a cabo los procesos de comunicación entre plantas.

Para ello se introdujeron plantas transgénicas *35S:MTS1* y control *pGreen* en cámaras herméticas de metacrilato (diseño experimental en apartado 5 de Materiales y Métodos) y se llevó a cabo un estudio de inducción del cierre estomático, puesto que se había descrito que algunos VOCs intervenían en la apertura de los estomas (Kabbas, 2015; Lisón *et al.*, 2017; Ozáez, 2017; Payá, 2017).

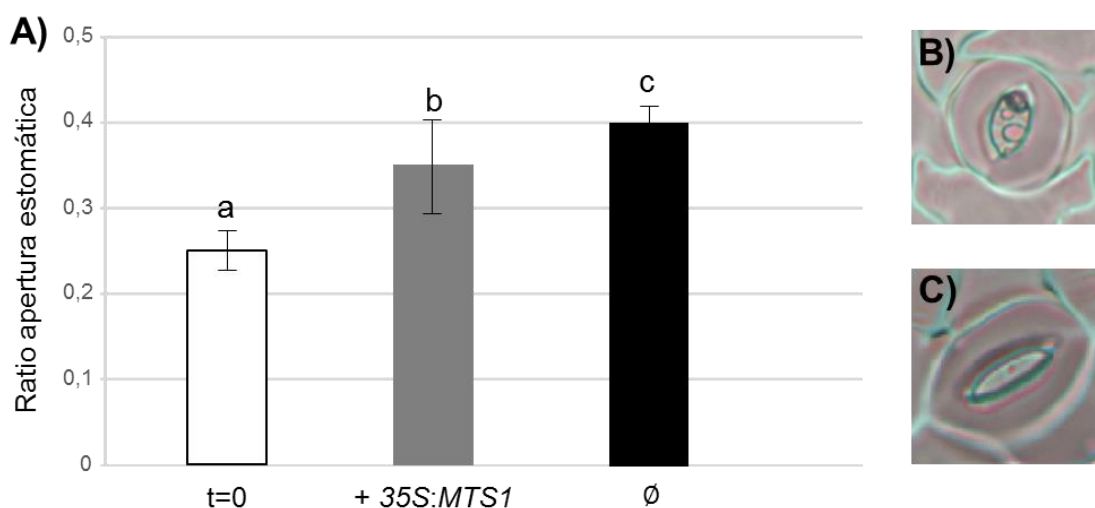


Figura 12. Ratio de apertura estomática de plantas de tomate *pGreen* en presencia o ausencia de plantas transgénicas *35S:MTS1*. (A) Índice de apertura estomática en hojas de tomate *pGreen* antes de introducirlas en las cámaras de metacrilato (t=0) y 24 h después de introducirlas en las cámaras en presencia de plantas transgénicas *35S:MTS1* (+*35S:MTS1*) y en ausencia de éstas (∅). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los ratios corresponden a la media ± el error estándar de al menos 50 estomas correspondientes a 4 plantas de un experimento representativo. Se llevó a cabo un análisis estadístico multifactorial de la varianza (ANOVA) con los datos correspondientes a todas las repeticiones y las diferentes letras distintas indican que existe significación estadística (*p-value* < 0,05). (B y C) Imágenes de estomas representativos de una planta *pGreen* en ausencia y en presencia de plantas *35S:MTS1*, respectivamente.

Al comparar los índices de apertura estomática (**Figura 12**) de las plantas antes de introducirlas en las cajas ($t=0$) y tras 24 h dentro de las mismas se observa que hay una apertura de estomas general, debido al aumento de humedad existente en el ambiente herméticamente cerrado. La transpiración de la propia planta hace que la temperatura y la humedad en el interior de la cámara aumenten haciendo que se induzca la apertura estomática. Sin embargo, como observamos, esta apertura es menor cuando las plantas se encuentran en presencia de las transgénicas que sobreexpresan *MTS1*. Esto nos indica que los volátiles producidos por dichas plantas transgénicas podrían ser los responsables de que haya un cierre estomático. Estos resultados confirman el papel del α -terpineol en la mediación del cierre estomático descrita por nuestro grupo (Kabbas, 2015), puesto que hemos observado que las plantas transgénicas *35S:MTS1* emiten constitutivamente dicho volátil (**Figura 10.A**).

Por otra parte, la hormona vegetal implicada en el cierre estomático por excelencia es el ácido abscísico (ABA) y en menor medida el JA (Huang *et al.*, 2008). Se ha descrito que tratamientos exógenos con JA en *Arabidopsis thaliana*, activan un conjunto de cascadas de señalización que conllevan al cierre de los estomas (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013). Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio. Así pues, como se ha mencionado anteriormente, la síntesis de linalool depende de la señalización en la planta por parte del JA, por lo que la emisión constitutiva de este volátil por parte de las plantas *35S:MTS1* (**Figura 10.A**), podría correlacionar con mayores niveles de JA que producirían el cierre estomático. De nuevo, resultaría de gran interés el estudio de los niveles de JA en estas plantas.

1.4 Estudio del efecto de plantas *35S:MTS1* sobre plantas vecinas: activación de resistencia frente a una infección bacteriana

Al observar que las plantas control en presencia de las plantas transgénicas *35S:MTS1* presentaban un menor ratio de apertura estomática, se decidió estudiar si dicho cierre era el suficiente como para frenar el paso de la bacteria *Pst* y obtener así una menor tasa de infección. Para ello se llevó a cabo la misma estrategia experimental que para los estudios de cierre estomático, solo que además se añadió una cámara más, en la que las plantas *pGreen* eran tratadas con α -terpineol, un compuesto que ha sido asociado al cierre estomático y que se usó como control positivo (Kabbas, 2015). Tras pasar 24h en las cámaras sometidas a diferentes tratamientos, se llevó a cabo una infección por inmersión con la bacteria *Pseudomonas syringae*.

Como se muestra en la **Figura 13** la cantidad de bacteria que presentan las plantas tras los tratamientos en las cámaras de metacrilato es muy similar, puesto que no hay diferencias significativas entre ellas. Esto parece indicarnos que a pesar de observar un cierre estomático previo en las plantas cuando estaban ante la presencia de *35S:MTS1*, dicho cierre no parece ser lo suficientemente estable como para frenar la entrada de la bacteria. Además observamos que el tratamiento volátil con α -terpineol es el que en mayor grado reduce la susceptibilidad a la bacteria, aunque se necesita realizar un tratamiento en spray sobre las hojas para observar las diferencias de modo significativo (Kabbas, 2015). Estos resultados, de nuevo concuerdan con la menor emisión del MeSA por parte de las plantas *35S:MTS1* que podría contrarrestar el efecto defensivo del cierre estomático producido por la sobre-emisión de terpenoides.

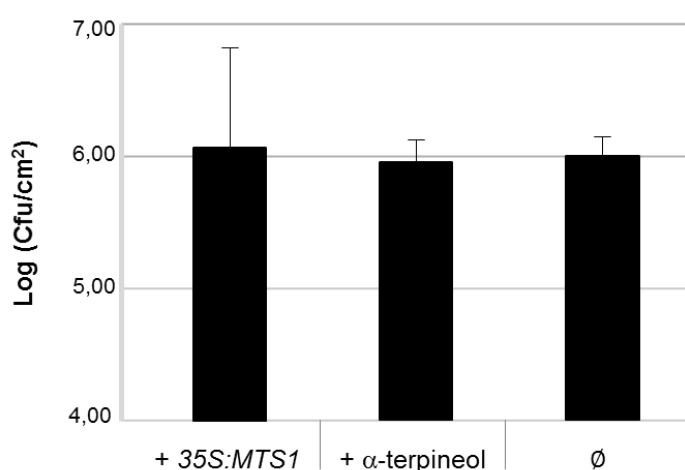


Figura 13. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* tras los tratamientos en cámaras de metacrilato. Unidades formadoras de colonias (Cfu) de la bacteria provenientes de las hojas de plantas *pGreen* infectadas a las 24 h tras estar sometidas previamente durante 24 h ante los diferentes tratamientos en las cámaras de metacrilato, en primer lugar, en presencia de plantas *35S:MTS1* (+ *35S:MTS1*), en segundo lugar sometidas a un tratamiento con α -terpineol (+ α -terpineol) y por último, cuando se encuentran solas en la caja (\emptyset). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm el error estándar de cuatro plantas independientes de un experimento representativo. Se realizó un análisis de *t* de Student con los datos procedentes pero no se observaron diferencias significativas.

Los resultados aquí expuestos son un ejemplo más del papel de los VOCs en lo que a comunicación entre plantas se refiere. El hecho de que estos compuestos viajen por el aire hace de ellos un mecanismo para transmitir señales de alta velocidad y largo alcance, lo que puede ser utilizado para diseñar nuevas herramientas biotecnológicas. Este tipo de plantas transgénicas de sobreexpresión *MTS1* podrían ser el primer paso para la creación de unas plantas cuya emisión de volátiles estableciese una señal constante que mantuviese a los cultivos colindantes de interés en un estado de alerta permanente, ya sea ante un ataque patogénico o ante diferentes condiciones ambientales.

2. CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA SALICILATO 5-HIDROXILASA (S5H) EN PLANTAS DE TOMATE

Antecedentes

Aunque todavía no se conoce mucho sobre las diferentes vías catabólicas del SA, no son pocas las investigaciones acerca de este tema. Una de las formas de degradar el SA es convirtiéndolo en GA, mediante una hidroxilación en el C5 del anillo aromático, lo que se conoce como actividad salicilato 5-hidroxilasa. En bacterias, esta actividad ha sido descrita en *Ralstonia* sp. cepa U2 y es llevada a cabo por un conjunto de 3 proteínas codificadas por 4 genes: la monoxigenasa NahGH, codificada por los genes *NahG* y *NahH*, una ferredoxina reductasa codificada por *NagAa* y una ferredoxina codificada por *NagAb* (Zhou *et al.*, 2002).

En plantas, se ha descrito una salicilato 3-hidroxilasa (S3H) como la enzima implicada en el catabolismo del SA. Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* muestran que el gen *S3H*, que es inducido por SA, es capaz de convertir *in vitro* el SA en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) y GA (2,5-DHBA). Además los ensayos con mutantes *s3h* y con líneas de sobreexpresión confirman la actividad catalítica hacia 2,3-DHBA *in vivo*. Estos mutantes presentaron una senescencia precoz, lo que llevó a los autores a proponer que el SA es un componente clave en la senescencia foliar (Zhang *et al.*, 2013).

En nuestro laboratorio se efectuó la búsqueda del gen de tomate ortólogo al *S3H* que había sido descrito en *Arabidopsis*, proponiendo la secuencia NM_001246911.1 como su posible ortólogo (Camps, 2014).

Para verificar que se trataba del gen propuesto, se llevó a cabo un estudio de su expresión en plantas de tomate sometidas a infecciones con patógenos de diferente naturaleza. Con ello se comprobó que existía una correlación entre la acumulación de GA y la inducción del gen propuesto como *S5H* (salicilato 5-hidroxilasa), cuyo producto es precisamente este compuesto fenólico.

Para comprobar la actividad *in vivo* del enzima, se preparó una construcción en un vector binario para lograr la sobreexpresión de *S5H* mediante expresión transitoria con *Agrobacterium tumefaciens* (Hernández, 2015). El estudio de expresión transitoria fue realizado en plantas de *Nicotiana benthamiana* a las cuales se les aplicó un tratamiento exógeno de SA que aportase el

sustrato de la enzima S5H. Una vez comprobada la expresión de esta enzima en las plantas agroinfiltradas, se procedió al estudio de la actividad salicilato 5-hidroxilasa *in vivo* mediante un análisis de SA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Tras analizar los niveles tanto de SA libre como total, se vio que las plantas que habían sido inoculadas con las cepas de *Agrobacterium* que contenían la construcción pGWB8-S5H presentaban una reducción significativa en la cantidad de SA libre y total con respecto a las plantas control. Además, se analizaron los niveles libres y totales de GA y de 2,3-dihidroxibenzoico con el fin de detectar los productos de la reacción, sin embargo no se observó un incremento significativo de ninguno de los dos compuestos (Hernández, 2015). Estos resultados parecen indicar que el SA es el sustrato de la enzima codificada por el gen propuesto como S5H.

Con el fin de estudiar la función que desempeña el gen S5H en la regulación de los niveles endógenos de SA, se procedió a transformar de manera estable plantas de tomate de la variedad MoneyMaker para que silencien o en su defecto reduzcan la expresión del gen S5H mediante RNA de interferencia (RNAi_S5H). Para ello, se utilizó la secuencia usada anteriormente para la expresión transitoria en *Nicotiana*.

En el presente Trabajo Final de Máster se pretende llevar a cabo la caracterización molecular y fenotípica de las plantas transgénicas de tomate RNAi_S5H, con el fin de confirmar la función de este gen y su participación en la respuesta defensiva de las plantas.

2.1 Estudio de la expresión de S5H en plantas de tomate ante diferentes infecciones

Debido a las numerosas investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio sobre las interacciones de planta de tomate con patógenos de diferente naturaleza, se dispone de una colección variada de muestras de las diferentes infecciones realizadas a lo largo del tiempo. Para conocer la implicación del gen S5H ante distintos tipos de infección se decidió llevar a cabo un estudio de la expresión de dicho gen en las diferentes muestras disponibles en el laboratorio.

Los niveles de expresión de *S5H* se midieron en muestras de plantas de tomate MoneyMaker infectadas con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd; *Citrus Exocortis Viroid*), el virus del bronceado del tomate (TSWV; *Tomato Spotted Wilt Virus*), el virus del mosaico del tomate (ToMV; *Tomato Mosaic Virus*) y la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, tanto con su forma virulenta (Δ *AvrPto*), como la avirulenta (*AvrPto*). Dichas infecciones activan en la planta diferentes mecanismos defensivos y los niveles de compuestos fenólicos producidos por las plantas para defenderse también varían entre ellas, lo que hacen de estas muestras un material de gran importancia para ver el papel que desempeña el gen *S5H*.

Se ha descrito que la infección de plantas de tomate MoneyMaker con CEVd o TSWV inducen una fuerte acumulación de SA y GA libre y total, que comienza en niveles basales muy bajos y que aumenta de manera considerable cuando aparecen los primeros síntomas de la enfermedad. Los niveles de GA, producto de la enzima *S5H*, aumentan a lo largo de ambos procesos de infección, sin embargo, la acumulación de SA es solo similar a la de GA en la infección viroidal mientras que en la viral se alcanza un nivel máximo tras la primera semana de la inoculación (López-Gresa *et al.*, 2016). Los niveles de GA observados en dicha investigación concuerdan con los niveles de expresión del gen *S5H* (**Figura 14**). Se puede observar que en la infección con CEVd, los niveles de expresión aumentan en las plantas infectadas con respecto a las inoculadas en ausencia de viroide (Mock), resultados que concuerdan con los altos niveles de GA observados durante dicha infección. En cuanto a la infección de las plantas de tomate con TSWV se observa un pico de expresión del gen a partir de la primera semana, lo que podemos asociar a la gran cantidad de SA que acumula la planta y que por consiguiente debe de metabolizar hacia productos menos tóxicos, como es el GA.

En cuanto a la infección con *Pst*, tanto con la cepa bacteriana que produce enfermedad (**Figura 14** *Pst* Δ *AvrPto*) como con la que no (**Figura 14** *Pst AvrPto*), observamos una inducción del gen en las plantas infectadas con respecto a las inoculadas sin la bacteria (Mock). Esta inducción coincide en gran medida con los niveles observados de GA y SA medidos en investigaciones anteriores por nuestro laboratorio (López-Gresa *et al.*, 2017). Ante ambas infecciones, se produce un

aumento en la cantidad de GA a las 48 h sobretodo en la infección virulenta, que es precisamente cuando se observa una mayor inducción de *S5H*.

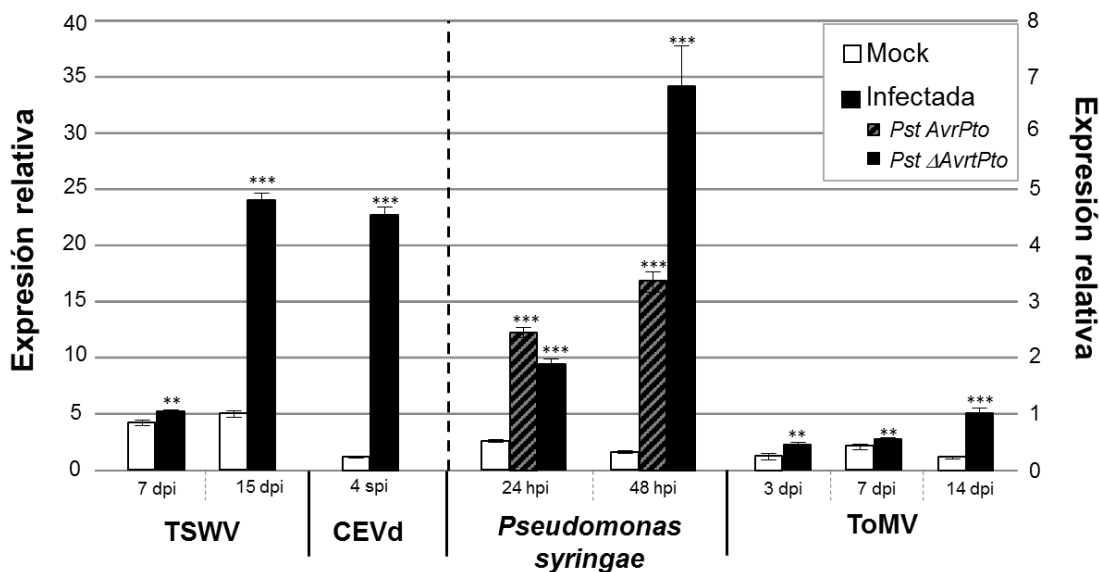


Figura 14. Análisis de expresión de *S5H* ante diferentes infecciones en plantas de tomate MoneyMaker. Expresión de *S5H* de plantas inoculadas sin el patógeno (Mock) y sometidas a infección con CEVd, TSWV, *Pst AvrPto*, *Pst ΔAvrPto* y ToMV. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica por la actina. Los niveles de expresión corresponden a la media ± el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. Las diferencias significativas entre las plantas mock y las infectadas se representan con dos asteriscos (**) cuando $p\text{-value} < 0,01$ y con tres asteriscos (***) cuando $p\text{-value} < 0,001$.

Por último, al observar los niveles de expresión alcanzados por el gen en la infección por ToMV, se puede apreciar que casi no hay inducción en la expresión de *S5H* tras la infección viral, por lo que parece ser que este gen no está implicado en la defensa de la planta frente a dicho patógeno. Estos datos correlacionan con los resultados observados por Bellés *et al.* (1999), en los que las plantas de tomate infectadas (en este caso de la variedad Rutgers) no acumulan GA ni de forma libre ni total.

A la vista de estos resultados, podemos concluir que la acumulación de SA y/o GA en las plantas asociada a una infección, correlaciona con la expresión de *S5H*, con el fin de disminuir los niveles del SA tóxico para la planta, dando como producto el GA que se observa en los análisis de dichas infecciones.

2.2 Niveles de expresión de *S5H* en plantas de tomate transgénicas *RNAi_S5H*

Una vez estudiado el patrón de expresión de *S5H* en diferentes infecciones patogénicas, decidimos llevar a cabo la caracterización molecular de las plantas de tomate transgénicas *RNAi_S5H*, que habían sido previamente generadas en nuestro laboratorio. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo un estudio de expresión génica de *S5H* mediante qRT-PCR en las líneas transgénicas (*RNAi_S5H* 16; 14; 6.1) y en su fondo genético (MM Control), a las 24 h después de haber sido infectadas con la bacteria virulenta (Figura 15).

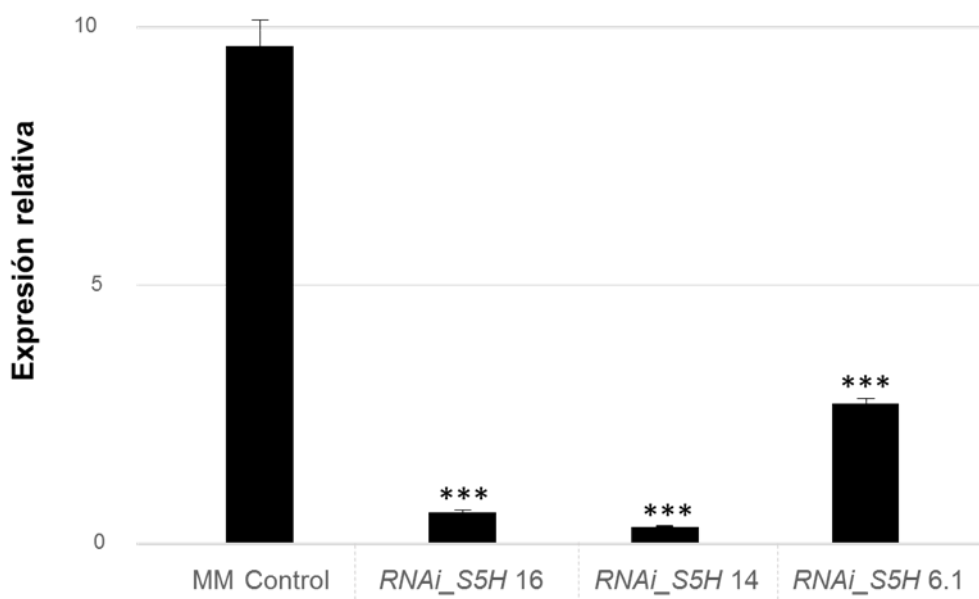


Figura 15. Análisis de expresión de *S5H* de las distintas líneas transgénicas de tomate MoneyMaker. Expresión de *S5H* de plantas control y transgénicas sometidas a infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Δ *AvrPto*. Se llevaron a cabo 5 experimentos independientes. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica para la proteína actina. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. Las diferencias significativas entre las plantas control y las líneas transgénicas se representan con tres asteriscos (***) ya que su valor $p < 0,001$.

Como se observa en la Figura 15 los niveles de expresión relativa de *S5H* en las tres líneas transgénicas presentan una disminución significativa de la expresión del gen con respecto a las plantas control tras la infección con la bacteria, por lo que se confirma el silenciamiento esperado en estas plantas.

2.3 Estudio de compuestos fenólicos libres y totales

Puesto que las líneas transgénicas *RNAi_S5H* no presentan inducción del gen como consecuencia de la infección, y con el fin de asociar la actividad salicilato 5-hidroxilasa a la enzima codificada por el gen *S5H* propuesto, se llevó a cabo un análisis mediante HPLC tanto de SA como de GA.

Ambos compuestos se acumulan en la planta en forma de glicoconjugados, por ello para poder conocer los niveles de cada uno de ellos que hay en la planta es necesario analizar sus niveles en forma libre y total, siendo la total la suma del compuesto en forma libre y en forma conjugada (ver Materiales y Métodos).

El estudio metabólico de SA y GA se llevó a cabo sobre las muestras obtenidas de la infección con *Pst*, con el fin de observar la evolución de ambos compuestos cuando la planta activa sus mecanismos defensivos.

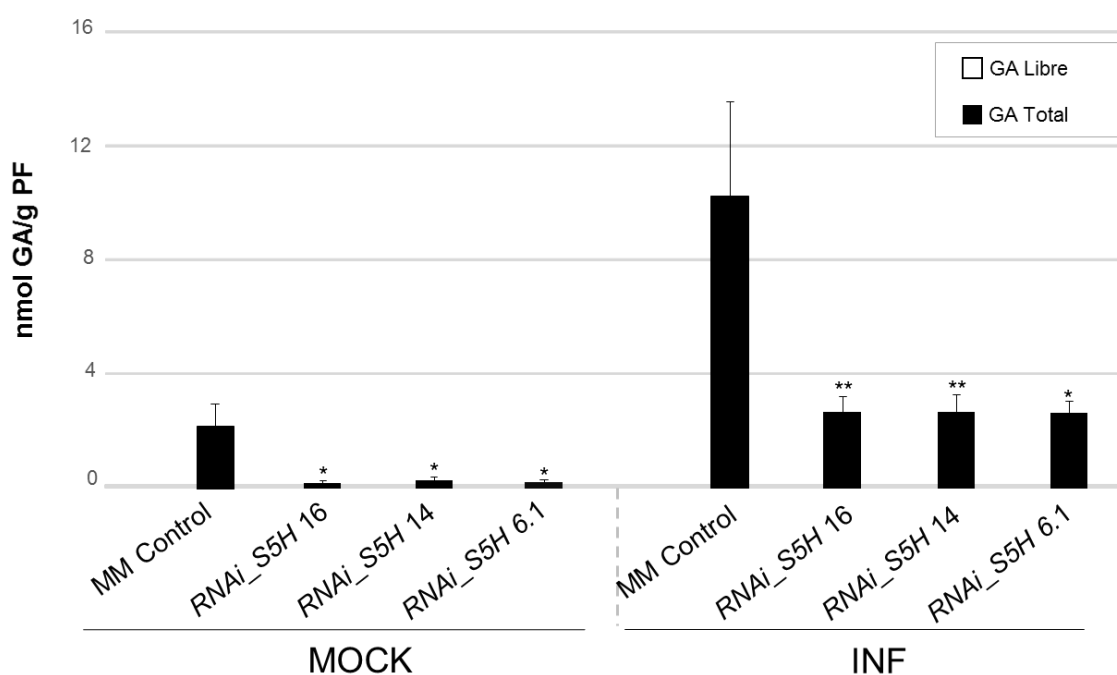


Figura 16. Acumulación de GA total en plantas de tomate MoneyMaker control y transgénicas infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Δ AvrPto. Se extrajeron compuestos fenólicos de hojas infectadas transcurridas 24 h tras la infección. Los extractos fueron analizados mediante HPLC de fluorescencia. Se muestra la media \pm el error estándar de 4 plantas independientes en un experimento representativo. Se llevaron a cabo 4 experimentos diferentes. Las diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas control se representan con un asterisco (*) cuando el p -value < 0,05 y con dos asteriscos (**) cuando p -value < 0,01.

En primer lugar (**Figura 16**) se muestran los valores de GA de las plantas sometidas a la infección con la bacteria, así como de sus correspondientes controles inoculados con la solución sin la bacteria (Mock). Tal y como se ha descrito, las plantas control no transgénicas muestran un aumento en los niveles de GA como consecuencia de una infección de tipo sistémico por *Pseudomonas* (Bellés *et al.*, 2006; Hernández, 2015). Sin embargo, las líneas transgénicas muestran una reducción significativa en los niveles totales de GA con respecto a las utilizadas como control, tanto en las plantas no inoculadas como en las infectadas.

La correlación observada entre el silenciamiento de *S5H* y los menores niveles de GA detectados parecen indicar que el GA sería el producto de la reacción catalizada por *S5H*.

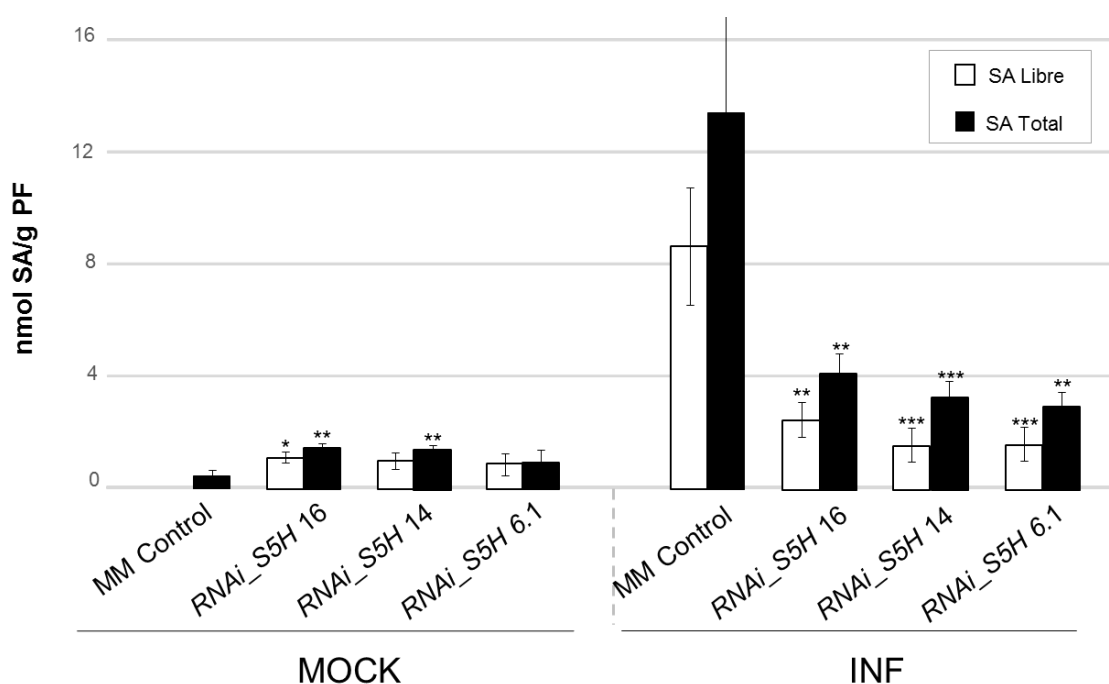


Figura 17. Acumulación de SA libre y total en plantas de tomate MoneyMaker control y transgénicas infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Δ AvrPto. Se extrajeron compuestos fenólicos de hojas infectadas transcurridas 24 h tras la infección. Los extractos fueron analizados mediante HPLC de fluorescencia. Se muestra la media \pm el error estándar de 4 plantas independientes en un experimento representativo. Se llevaron a cabo 4 experimentos diferentes. Las diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas control se representan con un asterisco (*) cuando el p -value < 0,05, con dos asteriscos (**) cuando p -value < 0,01 y con tres asteriscos (***) cuando p -value < 0,001.

Del mismo modo, en la **Figura 17** se muestran los niveles de SA tanto libre como total de las anteriores muestras. En este caso se observa que las plantas transgénicas sin infectar poseen unos niveles elevados de SA basales, tanto en su forma libre como en la cantidad total. La correlación entre la disminución de la expresión del gen y el aumento de la concentración de SA parecen indicar que el SA podría ser el sustrato de la enzima codificada por *S5H*.

Cabe resaltar que, a diferencia de las plantas no infectadas, los niveles de SA observados en las plantas transgénicas infectadas son menores que los de sus correspondientes controles. Estos resultados parecen indicar que los altos niveles de SA, los cuales podrían resultar tóxicos para la planta, serían desviados hacia otras rutas o maneras de almacenamiento diferentes a la conjugación con azúcares. Es por ello por lo que en un futuro se pretende llevar a cabo un análisis metabólico mediante espectrometría de masas con el fin de identificar estos posibles derivados de SA en las plantas transgénicas.

Asimismo, podría ocurrir que existieran varias isoformas del gen que participaran en el catabolismo del SA, tal y como se ha descrito recientemente en *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2017). Estos autores describen *S5H/DMR* (*Downy Mildew Resistant6*) como un gen que codifica para una salicilato 5-hidroxilasa, que resulta ser una isoforma de la anteriormente descrita como *S3H* por los mismos autores (Zhang *et al.*, 2013).

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por estos autores sobre la actividad salicilato hidroxilasa en *Arabidopsis thaliana*, en los cuales se observa una reducción significativa en los niveles de GA y un aumento, también significativo, en lo que se refiere a SA. Sin embargo, cabe destacar que el aumento de SA observado en *Arabidopsis* ocurre de manera más significativa en los dobles mutantes *s5hs3h*, en los que dos genes de *Arabidopsis* implicados en la hidroxilación del SA se encuentran mutados (Zhang *et al.*, 2013, 2017).

2.4 Crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* en plantas de tomate *RNAi_S5H* infectadas

Con el fin de estudiar el papel de *S5H* en la infección bacteriana, se llevó a cabo la inoculación con la cepa virulenta de la bacteria *Pst* de las plantas transgénicas *RNAi_S5H* así como de sus correspondientes controles y se llevó a cabo el conteo bacteriano a partir de hojas infectadas 24 horas después de la infección (hpi).

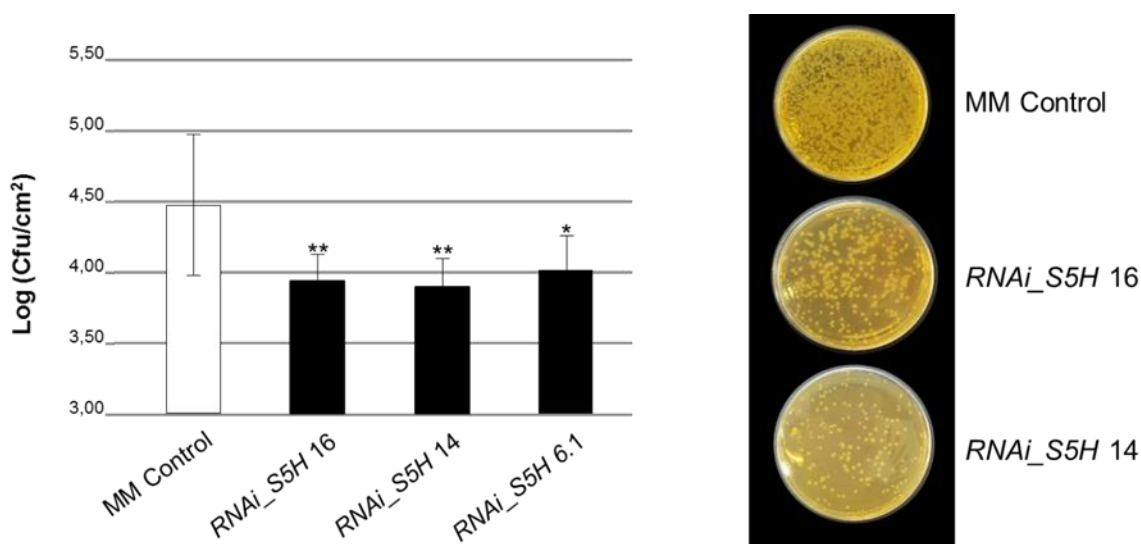


Figura 18. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. tomato Δ AvrPto en hojas de plantas MoneyMaker control y en plantas transgénicas *RNAi_S5H*. Se llevaron a cabo 5 experimentos diferentes. Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de 4 plantas independientes en un experimento representativo. Las diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas control se representan con un asterisco (*) cuando el *p-value* < 0,05 y con dos asteriscos (**) cuando *p-value* < 0,01.

Observando la **Figura 18** apreciamos una disminución significativa en el número de Cfu (unidades formadoras de colonias) en los tejidos infectados de las diferentes líneas transgénicas con respecto a su fondo genético (MM control) indicando que las plantas transgénicas *RNAi_S5H* presentan resistencia a la bacteria *Pst*. Esta resistencia podría deberse a los niveles de SA basales que las diferencian de las plantas utilizadas como control (**Figura 17**), ya que la SAR es dependiente de dicho metabolito y además activa en la planta una inmunidad de amplio espectro ante patógenos (Shah, 2003; Durrant y Dong, 2004; Vlot *et al.*, 2009).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zhang y colaboradores (2017), en los que demostraron un aumento de la resistencia de *Arabidopsis thaliana* frente a una infección por *Pst* DC3000 de las plantas mutantes en *S5H* y en las dobles mutantes *s5hs3h*. Además, los autores muestran también el comportamiento ante la bacteria de dos líneas de sobreexpresión de ambos genes que resultan ser más susceptibles al ataque por *Pst* (Zhang *et al.*, 2017).

2.5 Estudio de senescencia asociada a *S5H*

Investigaciones previas sobre la actividad salicilato hidroxilasa en plantas, más en concreto en *Arabidopsis*, relacionaron la carencia de la enzima que llevaba a cabo esta reacción con una respuesta senescente avanzada (Zhang *et al.*, 2013). Es por ello por lo que se decidió estudiar dicho fenotipo en las plantas transgénicas generadas en el laboratorio.

Para el estudio de esta senescencia se dejaron crecer 5 plantas de cada una de las líneas transgénicas y de su fondo genético (MM Control) durante 10 semanas, que es el periodo en el cual las tomateras alcanzan un grado de desarrollo muy avanzado en condiciones de invernadero.

Analizando las **Figuras 19 y 20** podemos observar cómo en las plantas transgénicas *RNAi_S5H* la clorosis asociada a la senescencia aparece de manera más precoz dando lugar incluso a la caída de las hojas (línea *RNAi_S5H* 6.1). Este cambio en la tonalidad se debe a la pérdida de clorofilas hacia otros pigmentos fotosintéticos como son los carotenos y las xantofilas (Junker y Ensminger, 2016). Así por ejemplo, a las 10 semanas observamos que las plantas control todavía poseen aproximadamente un 50% de las hojas verdes, mientras que en las líneas transgénicas la totalidad de las hojas observadas ha cambiado de la tonalidad verde hacia los diferentes amarillos y el marrón, o a la caída de la hoja.

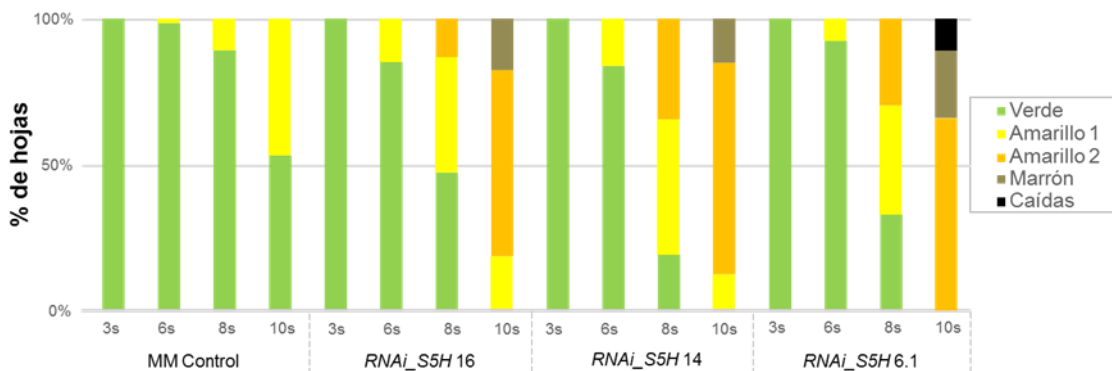


Figura 19. Evolución de la senescencia en folíolos de tomate MM y *RNAi_S5H*. Un total de 5 plantas de cada tipo fueron observadas durante un periodo de 10 semanas. Se muestra el porcentaje de folíolos de misma apariencia con respecto al total de folíolos correspondientes a la tercera, cuarta y quinta hojas de las plantas de tomate MM y transgénicas a las 3, 6, 8 y 10 semanas de crecimiento. “Verde” hace referencia al color natural de las hojas de tomate, “Amarillo 1” cuando las hojas comienzan a envejecer y adquieren manchas amarillentas, “Amarillo 2” es el momento en el cual la hoja se torna completamente amarilla, “Marrón” cuando aparecen marcas necróticas debido al envejecimiento y “Caídas” define aquellas hojas que se han desprendido de la planta o que en su defecto son necróticas completamente.

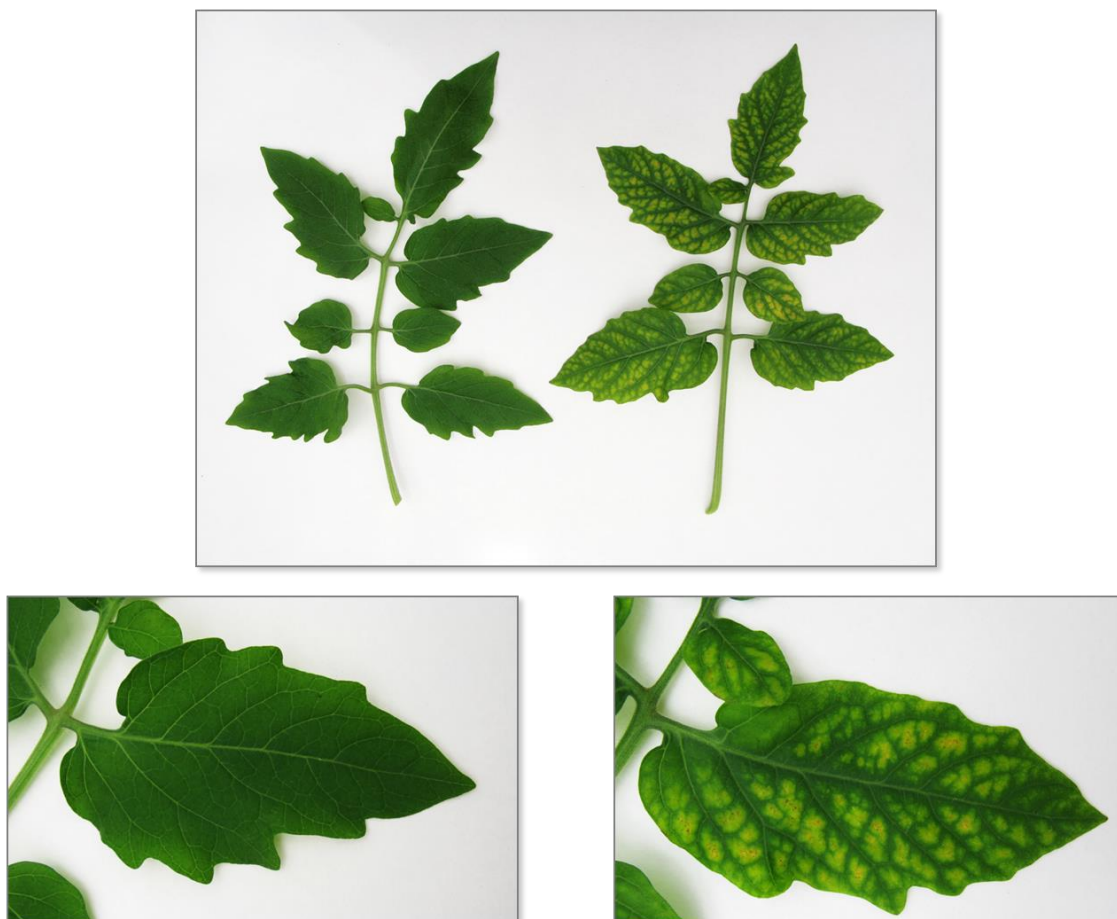


Figura 20. Cuarta hoja de plantas MoneyMaker control y transgénicas de silenciamiento en *S5H*. Esta imagen muestra, arriba, la comparación en la coloración entre las plantas MoneyMaker no transgénicas y una de las líneas transgénicas *RNAi_S5H* a las 4 semanas de crecimiento. Abajo aparece un detalle de la apariencia de uno de los folíolos de ambos tipos de plantas.

Para reforzar los datos obtenidos mediante la visualización fenotípica, se llevó a cabo un análisis de expresión génica de *PR1* (*Pathogenesis Related 1*), cuya expresión se relaciona con la respuesta defensiva de la planta asociada a SA.

Como se muestra en la **Figura 21**, los niveles de expresión de *PR1* aumentan conforme avanza la edad de la planta tanto en las plantas control como en las transgénicas, lo que hace que este gen pueda ser considerado también como marcador de senescencia. Asimismo, se observa una mayor expresión de *PR1* en las líneas transgénicas con respecto a las control, lo que se podría correlacionar con los niveles de SA basales observados a la pre-infección por *Pst* (**Figura 17**).

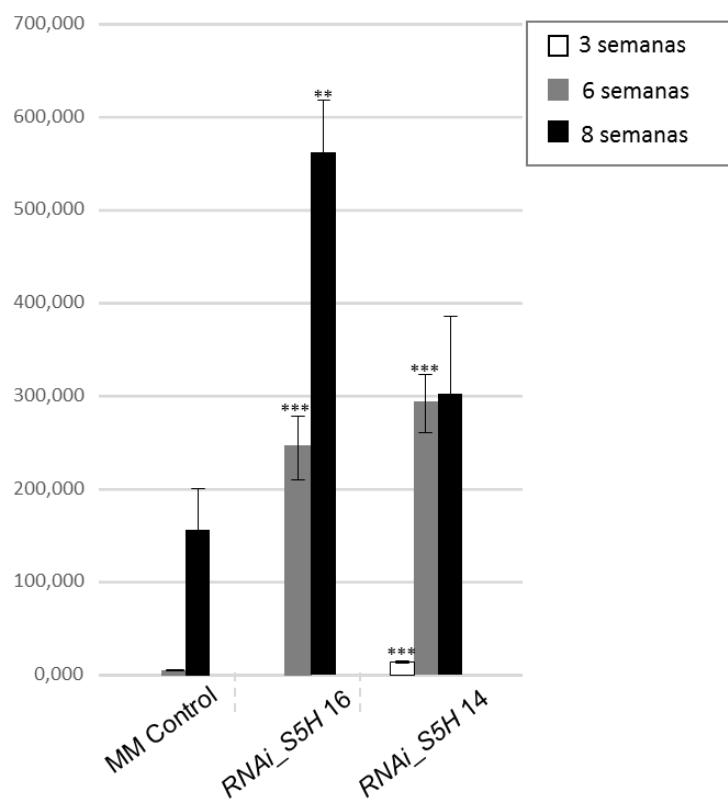


Figura 21. Expresión de *PR1* en plantas MoneyMaker control y en las transgénicas *RNAi_S5H* a lo largo del desarrollo. Niveles de expresión de *PR1* en las plantas transgénicas como en su fondo genético durante la observación del fenotipo de senescencia. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen codificante para la proteína actina. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. Las diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas control se representan con dos asteriscos (**) cuando $p\text{-value} < 0,01$ y con tres asteriscos (***) cuando $p\text{-value} < 0,001$.

Con el fin de profundizar en el papel del SA en la senescencia de las hojas resultaría de gran interés medir los niveles de SA en las plantas control y en las transgénicas a lo largo del desarrollo. Asimismo, sería interesante el estudio del papel del GA en dicha senescencia, para lo que, además de medir sus niveles, se podrían realizar aplicaciones exógenas con dicho compuesto para ver si es la falta de este compuesto la que provoca la senescencia anticipada o por el contrario son los propios niveles del SA los que causan dicho fenotipo.

Los datos obtenidos al estudiar la senescencia temprana de las plantas de tomate cuya expresión de *S5H* está disminuida coinciden con los descritos previamente en *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2013, 2017), reforzando así el posible papel de SA y la enzima S5H en senescencia.

Así pues, y a la vista de los resultados aquí obtenidos queda más clara la implicación de la enzima salicilato 5-hidroxilasa en la respuesta defensiva de las plantas. La caracterización de dicha enzima y de su correspondiente gen en tomate aportan datos para una mejor comprensión de cómo el ácido salicílico es degradado por la planta para evitar su citotoxicidad, la cual queda patente en la senescencia avanzada que presentan las plantas transgénicas aquí presentadas. Estos resultados ponen de manifiesto una vez más no solo la importancia del SA en la planta, sino también de los productos derivados de su metabolismo, como es el GA.

Los resultados mostrados en el presente Trabajo Final de Máster muestran la importancia que los metabolitos secundarios de las plantas poseen, y en este caso concreto, en la interacción de las plantas con organismos patogénicos. Estos resultados son un pequeño ejemplo del amplio abanico de compuestos que poseen las plantas para hacer frente a las amenazas causadas por los diferentes organismos que buscan atacarlas para beneficiarse de una u otra forma.

V

CONCLUSIONES

1. Las plantas transgénicas de tomate *35S:MTS1* emiten unos niveles superiores de terpenoides que son capaces de inducir el cierre estomático en las plantas vecinas, sugiriendo que los terpenoides desempeñan una función en la comunicación entre plantas.
2. El gen *S5H* de tomate se induce en infecciones patogénicas en las que se produce un aumento en SA y/o GA, indicando que podría estar implicado en el metabolismo de estos compuestos fenólicos.
3. Plantas transgénicas de tomate *RNAi_S5H* presentan unos niveles basales de SA superiores a los de sus correspondientes plantas control y unos niveles de GA inferiores, tanto antes como después de la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, confirmando la actividad *in vivo* de *S5H* como una salicilato 5-hidroxilasa.
4. Las plantas transgénicas *RNAi_S5H* presentan una mayor resistencia ante la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que su fondo genético, indicando que este gen desempeña una función defensiva frente a dicha bacteria.
5. El silenciamiento de *S5H* conlleva un fenotipo de senescencia avanzada, que da como resultado una clorosis prematura en las hojas y un aumento en los niveles de PR1, lo que sugiere que dicho gen juega un importante papel en la senescencia de las plantas.

VI BIBLIOGRAFÍA

- Agrios GN, 2013. Introducción a la fitopatología. In: *Journal of Chemical Information and Modeling*. 1689–1699.
- Alvarez ME, 2000. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology* 44, 429–442.
- Ashour M, Wink M, Gershenzon J, 2010. Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. In: *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition*. 258–303.
- Baltrus DA, McCann HC, Guttman DS, 2017. Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology* 18, 152–168.
- Bartsch M, Bednarek P, Vivancos PD, Schneider B, von Roepenack-Lahaye E, Foyer CH, Kombrink E, Scheel D, Parker JE., 2010. Accumulation of isochorismate-derived 2,3-dihydroxybenzoic 3-O- β -D-xyloside in *Arabidopsis* resistance to pathogens and ageing of leaves. *Journal of Biological Chemistry* 285, 25654–25665.
- Beckers GJM, Spoel SH, 2006. Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* 8, 1–10.
- Beggs CJ, Kuhn K, Böcker R, Wellmann E, 1987. Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. Enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* 172, 121–126.
- Bellés JM, Garro R, Fayos J, Navarro P, Primo J, Conejero V, 1999. Gentisic Acid As a Pathogen-Inducible Signal, Additional to Salicylic Acid for Activation of Plant Defenses in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 227–235.
- Bellés JM, Garro R, Pallás V, Fayos J, Rodrigo I, Conejero V, 2006. Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta* 223, 500–511.
- Boller T, Felix G, 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60, 379–406.
- Boureau T, Routtu J, Roine E, Taira S, Romantschuk M, 2002. Localization of hrpA-induced *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in infected tomato leaves. *Molecular Plant Pathology* 3, 451–460.
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R, 2002. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*.
- Campos L, Lisón P, López-Gresa MP, Rodrigo I, Zacarés L, Conejero V, Bellés JM, 2014. Transgenic Tomato Plants Overexpressing Tyramine N-Hydroxycinnamoyltransferase Exhibit Elevated Hydroxycinnamic Acid Amide Levels and Enhanced Resistance to *Pseudomonas syringae*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 27, 1159–69.
- Camps G, 2014. Caracterización del fenotipo metabólico de plantas transgénicas NagI. Estudio del patrón de expresión del posible gen de tomate S5H. Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Valencia.
- Canet J V., Dobón A, Ibáñez F, Perales L, Tornero P, 2010. Resistance and biomass in *Arabidopsis*: A new model for Salicylic Acid perception. *Plant Biotechnology Journal* 8, 126–141.

- Carrie C, Murcha MW, Millar AH, Smith SM, Whelan J, 2007. Nine 3-ketoacyl-CoA thiolases (KATs) and acetoacetyl-CoA thiolases (ACATs) encoded by five genes in *Arabidopsis thaliana* are targeted either to peroxisomes or cytosol but not to mitochondria. *Plant Molecular Biology* 63, 97–108.
- Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V, 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194, 541–549.
- Conrath U, 2006. Systemic Acquired Resistance. *Plant physiology* 104, 1109–1112.
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I, 2013. Open or Close the Gate – Stomata Action Under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science* 4.
- Dean J V., Mohammed LA, Fitzpatrick T, 2005. The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* 221, 287–296.
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J, 1994. A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247–1250.
- Dixon RA, Paiva NL, 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* 7, 1085.
- Durrant WE, Dong X, 2004. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42, 185–209.
- Flor, 1971. Current Status of the Gene-for-Gene. *North* 9, 275–296.
- Gimenez-Ibanez S, Boter M, Ortigosa A, García-Casado G, Chini A, Lewsey MG, Ecker JR, Ntoukakis V, Solano R, 2017. JAZ2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytologist* 213, 1378–1392.
- Hernández M, 2015. Caracterización de plantas transgénicas NagI frente a la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv . tomato DC3000 y estudio de la posible actividad Salicilato 5-Hidroxilasa en tomate. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia.
- Hirano SS, Upper CD, 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 64, 624–53.
- Horvath DM, Chua N-H, 1996. Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Molecular Biology* 31, 1061–1072.
- Hsieh MH, Chang CY, Hsu SJ, Chen JJ, 2008. Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in *ispD* and *ispE* albino mutants in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 66, 663–673.
- Huang J, Cardoza YJ, Schmelz EA, Raina R, Engelberth J, Tumlinson JH, 2003. Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta* 217, 767–775.
- Huang J, Schmelz EA, Alborn H, Engelberth J, Tumlinson JH, 2005. Phytohormones mediate volatile emissions during the interaction of compatible and incompatible pathogens: The role of ethylene in *Pseudomonas syringae* infected tobacco. *Journal of Chemical Ecology* 31, 439–459.
- Huang D, Wu W, Abrams SR, Cutler AJ, 2008. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany* 59, 2991–3007.

- Huang XZ, Xiao YT, Köllner TG, Jing WX, Kou JF, Chen JY, Liu DF, Gu SH, Wu JX, Zhang YJ, Guo YY, 2017. The terpene synthase gene family in *Gossypium hirsutum* harbors a linalool synthase GhTPS12 implicated in direct defence responses against herbivores. *Plant Cell and Environment*, 261–274.
- Hückelhoven R, 2007. Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* 45, 101–127.
- Ibrahim RK, Towers GHN, 1959. Conversion of salicylic acid to gentisic acid and o-pyrocatechuic acid, all labelled with carbon-14, in plants. *Nature* 184, 1803.
- Jeandet P, Clément C, Courot E, Cordelier S, 2013. Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 14136–14170.
- Jones JDG, Dangl JL, 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Junker LV, Ensminger I, 2016. Relationship between leaf optical properties, chlorophyll fluorescence and pigment changes in senescing *Acer saccharum* leaves. *Tree Physiology* 36, 694–711.
- Kabbas E, 2015. Estudio del papel de compuestos volátiles de tomate en la defensa frente a una infección bacteriana. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia
- Kachroo A, Robin GP, 2013. Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 16, 527–533.
- Kant MR, Ament K, Sabelis MW, Haring MA, Schuurink RC, 2004. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant physiology* 135, 483–95.
- Korkina LG, 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health. *Cellular and Molecular Biology* 53, 15–25.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ, 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* 44, 135–162.
- Lisón P, López-Gresa MP, Rodrigo I, Bellés JM., 2017. HB as a new crop shield. (P201730685)
- López-Gresa MP, Lisón P, Campos L, Rodrigo I, Rambla JL, Granell A, Conejero V, Bellés JM, 2017. A Non-targeted Metabolomics Approach Unravels the VOCs Associated with the Tomato Immune Response against *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Plant Science* 8, 1–15.
- López-Gresa MP, Lisón P, Yenush L, Conejero V, Rodrigo I, Bellés JM, 2016. Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to citrus exocortis viroid and tomato spotted wilt virus. *PLoS ONE* 11.
- López-Gresa MP, Maltese F, Bellés JM, Conejero V, Kim HK, Choi YH, Verpoorte, R, 2010. Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochemical Analysis* 21, 89–94.
- Lutwak-Mann C, 1943. The Excretion of a Metabolic Product of Salicylic Acid. *Biochemical Journal* 37, 246–248.
- Markus Lange B, Ahkami A, 2013. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities. *Plant Biotechnology Journal* 11, 169–196.
- Matzinger P, 2007. Friendly and dangerous signals: Is the tissue in control? *Nature Immunology* 8, 11–13.

- Meher HC, Gajbhiye VT, Singh G, 2011. Salicylic acid-induced glutathione status in tomato crop and resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Journal of Xenobiotics* 1, 22–28.
- Melotto M, Underwood W, He SY, 2008. Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual Review of Phytopathology* 46, 101–122.
- Melotto M, Zhang L, Oblessuc PR, He SY, 2017. Stomatal Defense a Decade Later. *Plant Physiology* 174, 561–571.
- Miura K, Tada Y, 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Nakahara KS, Masuta C, 2014. Interaction between viral RNA silencing suppressors and host factors in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 20, 88–95.
- Newman M-A, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G, 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* 4, 1–14.
- Niinemets Ü, Kännaste A, Copolovici L, 2013. Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Frontiers in Plant Science* 4.
- Nobuta K, Okrent RA, Stoutemyer M, Rodibaugh N, Kempema L, Wildermuth MC, Innes RW, 2007. The GH3 Acyl Adenylase Family Member PBS3 Regulates Salicylic Acid-Dependent Defense Responses in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY* 144, 1144–1156.
- O'Donnell PJ, Schmelz EA, Moussatche P, Lund ST, Jones JB, Klee HJ, 2003. Susceptible to intolerance - A range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. *Plant Journal* 33, 245–257.
- Ozáez M, 2017. Papel defensivo de los compuestos volátiles de hoja verde en plantas de tomate frente a una infección bacteriana. Trabajo Fin de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Park S-W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF, 2007. Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science* 318, 113–116.
- Payá Montes C, 2017. Estudio del papel defensivo y del mecanismo de acción de los ésteres del Z-3-hexenol en plantas de tomate frente a *Pseudomonas syringae*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pickett JA, Khan ZR, 2016. Plant volatile-mediated signalling and its application in agriculture: successes and challenges. *New Phytologist* 212, 856–870.
- Riedlmeier M, Ghirardo A, Wenig M, Knappe C, Koch K, Georgii E, Dey S, Parker JE, Schnitzler JP, Vlot C, 2017. Monoterpenes support systemic acquired resistance within and between plants. *The Plant Cell*, tpc.00898.2016.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG, 2011. Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 49, 317–343.
- Roberts SC, 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology* 3, 387–395.
- Ronald PC, Salmeron JM, Carland FM, Staskawicz BJ, 1992. The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *Journal of Bacteriology* 174, 1604–1611.

- Ryals J a, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD, 1996. Systemic Acquired Resistance. *The Plant cell* 8, 1809–1819.
- Scalschi L, Vicedo B, Camañes G, Fernandez-Crespo E, Lapeña L, González-Bosch C, García-Agustín P, 2013. Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways. *Molecular Plant Pathology* 14, 342–355.
- Van Schie CCN, Haring MA, Schuurink RC, 2007. Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Molecular Biology* 64, 251–263.
- Shah J, 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 365–371.
- Shah J, Chaturvedi R, Chowdhury Z, Venables B, Petros RA, 2014. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *Plant Journal* 79, 645–658.
- Singh B, Sharma RA, 2015. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. 3 *Biotech* 5, 129–151.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP, 1997. Systemic acquired resistance. *Annual review of phytopathology* 35, 235–270.
- Tornero P, Conejero V, Vera P, 1993. Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding a (*Lycopersicon esculentum*). , 2749.
- Uquillas C, Letelier I, Blanco F, Jordana X, Holuigue L, 2004. NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in Arabidopsis. *Molecular plant-microbe interactions* 17, 34–42.
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF, 2009. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* 47, 177–206.
- Walker N, Evans WC, 1952. Pathways in the metabolism of the monohydroxybenzoic acids by soil bacteria. *Biochem. J.* 52: 23
- Wang Y, Liu JH, 2012. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates occurrence of citrus canker in susceptible navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Journal of Plant Physiology* 169, 1143–1149.
- Weber H, Vick BA, Farmer EE, 1997. Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 10473–10478.
- Whalen MC, 1991. Identification of *Pseudomonas syringae* Pathogens of Arabidopsis and a Bacterial Locus Determining Avirulence on Both Arabidopsis and Soybean. *the Plant Cell Online* 3, 49–59.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM, 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562–565.
- Wink M, 2010. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*.
- Xin X-F, He SY, 2013. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology* 51, 473–498.
- Yalpani N, Leon J, Lawton MA, Raskin I, 1993. Pathway of Salicylic Acid Biosynthesis in Healthy and Virus-Inoculated Tobacco. *Plant physiology* 103, 315–321.

- Yamaguchi Y, Huffaker A, 2011. Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 351–357.
- Young JM, 1991. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Annals of Applied Biology* 118, 283–298.
- Zhang K, Halitschke R, Yin C, Liu C-J, Gan S-S, 2013. Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 14807–14812.
- Zhang Y, Zhao L, Zhao J, Li Y, Wang J, Guo R, Gan SS, Liu CJ, Zhang K, 2017. S5H/DMR6 Encodes a Salicylic Acid 5-Hydroxylase that Fine-Tunes Salicylic Acid Homeostasis. *Plant Physiology*, pp.00695.2017.
- Zheng XY, Spivey NW, Zeng W, Liu PP, Fu ZQ, Klessig DF, He SY, Dong X, 2012. Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host and Microbe* 11, 587–596.
- Zhou NY, Al-Dulayymi J, Baird MS, Williams PA, 2002. Salicylate 5-hydroxylase from *Ralstonia* sp. strain U2: A monooxygenase with close relationships to and shared electron transport proteins with naphthalene dioxygenase. *Journal of Bacteriology* 184, 1547–1555.