

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**Estudio de la función y el mecanismo de acción de
MTS1 en la respuesta defensiva de plantas de
Solanum lycopersicum frente a la infección con
*Pseudomonas syringae***

Curso académico: 2017/2018

Alumno: Alejandro Torres Moncho

Tutor: D. Ismael Rodrigo Bravo

Cotutora: Dña. Celia Payá Montes

Valencia, julio 2018

Título: Estudio de la función y el mecanismo de acción de *MTS1* en la respuesta defensiva de plantas de *Solanum lycopersicum* frente a la infección con *Pseudomonas syringae*.

Resumen

En respuesta a diferentes agresiones por parte del entorno, tanto de tipo biótico como abiótico, las plantas han desarrollado a lo largo de su evolución distintos sistemas de señalización y defensa, tales como la síntesis de proteínas defensivas o compuestos químicos de muy variada naturaleza. Entre otros, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) se incluyen en este grupo de compuestos defensivos. Algunos de estos VOCs son compuestos monoterpénicos que intervienen en la comunicación entre plantas y que podrían originar una mayor resistencia frente a la infección por la bacteria *Pseudomonas syringae*.

En el presente Trabajo de Fin de Grado se plantea el estudio de la función de una monoterpreno sintasa (*MTS1*) en la respuesta defensiva de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Este enzima, que participa en el metabolismo secundario de las plantas, interviene en la producción de VOCs monoterpénicos, tales como alfa-terpineol o linalool, cuya aplicación exógena da lugar al cierre estomático. De esta forma, el objetivo del trabajo consiste en observar el efecto que genera el silenciamiento del gen *MTS1*, responsable de la emisión de diversos monoterpénicos, en plantas resistentes a la infección bacteriana como consecuencia de una interacción de tipo incompatible. Para ello, se realizará tanto el análisis de diferentes moléculas señalizadoras acumuladas ante el ataque del patógeno, como la comprobación del incremento de la apertura estomática y la presencia de la bacteria en las plantas transgénicas, debido a que los estomas son una de las posibles vías de entrada de patógenos bacterianos.

Nuestros estudios pueden ampliar el conocimiento acerca de la importancia de los VOCs monoterpénicos en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos. Una vez conocida la importancia del gen *MTS1* en la comunicación entre plantas, su papel relevante en la respuesta defensiva lo convierte en una futura herramienta biotecnológica, pues la obtención de plantas transgénicas que aumenten la expresión del gen dará lugar también a un aumento de la respuesta defensiva en las plantas vecinas, convirtiéndose así en una estrategia de gran utilidad en la protección sostenible de cultivos.

Palabras clave: Monoterpreno sintasa 1; *Pseudomonas syringae*; resistencia; *Solanum lycopersicum*; estomas; VOCs.

Alumno: D. Alejandro Torres Moncho.

Localidad y fecha: Valencia, julio de 2018.

Tutor académico: Prof. D. Ismael Rodrigo Bravo.

Cotutora: Dña. Celia Payá Montes.

Title: Study of the function and mechanism of action of *MTS1* in the defensive response of *Solanum lycopersicum* plants against infection with *Pseudomonas syringae*.

Abstract

In response to different aggressions by the environment, both biotic and abiotic, plants have developed throughout their evolution different signaling and defense systems, such as the synthesis of defensive proteins or chemical compounds of very varied nature. Among others, volatile organic compounds (VOCs) are included in this group of defensive compounds. Some of these VOCs are monoterpenic compounds that intervene in the interplant communication and that could cause greater resistance to infection by the bacterium *Pseudomonas syringae*.

In the present Degree Final Project, the study of the function of a monoterpene synthase (MTS1) in the defensive response of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) against the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 is proposed. This enzyme, which participates in the secondary metabolism of plants, is involved in the production of monoterpenic VOCs, such as alpha-terpineol or linalool, whose exogenous application leads to stomatal closure. In this way, the objective of the work is to observe the effect generated by the silencing of the *MTS1* gene, responsible for the emission of various monoterpenes, in plants resistant to bacterial infection as a result of an incompatible type interaction. For this, both the analysis of different signaling molecules accumulated before the attack of the pathogen, as well as the verification of the increase of the stomatal opening and the presence of the bacterium in the transgenic plants, will be carried out, because the stomata are one of the possible routes of entry of bacterial pathogens.

Our studies can expand the knowledge about the importance of monoterpenic VOCs in the defensive response of plants to pathogens. Once the importance of the *MTS1* gene in the interplant communication is known, its relevant role in the defensive response makes it a future biotechnological tool, since the obtaining of transgenic plants that increase the expression of the gene will also lead to an increase in the response defensive in neighboring plants, thus becoming a very useful strategy in the sustainable protection of crops.

Key words: Monoterpene synthase 1; *Pseudomonas syringae*; resistance; *Solanum lycopersicum*; stomata; VOCs.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores en este trabajo por su gran apoyo y dedicación. A Celia, por su tiempo, por toda su ayuda y amabilidad, y por darme siempre los mejores consejos en cualquier circunstancia. A Ismael, por sus valiosos conocimientos que me ha sabido transmitir.

Dar gracias a Mapi y a Puri, por su comprensión y sus ánimos, y por haberme permitido llevar a cabo este proyecto. A José María, por su cercanía. También quisiera agradecer a todos mis compañeros del laboratorio, por el buen ambiente que se respira en el laboratorio. Ha sido un placer pertenecer a este equipo.

Por último, agradecer a mi familia todo su apoyo y confianza. En especial a mis padres, por su constante interés y ayuda, y por haber permitido que todo esfuerzo fuese siempre mucho más llevadero.

ÍNDICE TEMÁTICO

1. Introducción.....	1
1.1. La respuesta defensiva de plantas	1
1.1.1. Percepción del patógeno	1
1.1.1.1. Reconocimiento inespecífico: respuesta defensiva activada por PAMPs	1
1.1.1.2. Reconocimiento específico: respuesta defensiva activada por efectores	3
1.1.2. Señalización de la respuesta defensiva.....	4
1.1.3. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 como patógeno de plantas.....	6
1.2. Papel de los compuestos orgánicos volátiles en la interacción tomate- <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	7
1.2.1. Rutas de biosíntesis de terpenos.....	7
1.2.2. Papel de los terpenos en la respuesta defensiva de plantas frente a patógenos	9
2. Objetivos	10
3. Materiales y métodos	11
3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	11
3.1.1. Germinación de semillas	11
3.1.2. Condiciones de cultivo	11
3.2. Material microbiológico y proceso de infección.....	12
3.2.1. Preparación del inóculo bacteriano	12
3.2.2. Infección bacteriana	13
3.3. Toma de muestras.....	13
3.4. Estudio del crecimiento bacteriano	13
3.5. Medida de la apertura estomática.....	14
3.6. Análisis cuantitativo de transcritos mediante PCR cuantitativa.....	14
3.6.1. Extracción de RNA total	14
3.6.2. Cuantificación de RNA	14
3.6.3. Precipitación de RNA con cloruro de litio	15
3.6.4. Tratamiento con DNAsa	15
3.6.5. Retrotranscripción.....	15
3.6.6. Amplificación cuantitativa de cDNA (PCR cuantitativa)	15
3.7. Tratamiento estadístico de datos	16
4. Resultados y discusión	17
4.1. Selección de líneas transgénicas que silencien el gen <i>MTS1</i>	17
4.2. Estudio del efecto del silenciamiento de <i>MTS1</i> en la apertura estomática.....	19
4.3. Estudio de los niveles de expresión de genes implicados en rutas de señalización de la respuesta defensiva	20
4.3.1. Inducción de la ruta de señalización del ácido salicílico.....	20
4.3.2. Silenciamiento de la ruta de señalización del ácido abscísico	22

4.3.3. Silenciamiento de la ruta de señalización del ácido jasmónico.....	24
4.4. Estudio del efecto del silenciamiento de <i>MTSI</i> en la resistencia frente a la infección de la bacteria avirulenta <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.....	25
4.5. Perspectivas futuras.....	26
5. Conclusiones	28
6. Bibliografía	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modelo gen-a-gen (Flor, 1971). La interacción entre las proteínas codificadas por el gen de resistencia (<i>R</i>) de la planta y por el gen de avirulencia (<i>Avr</i>) del patógeno da lugar a una interacción de tipo incompatible (-), causante de la resistencia de la planta a la enfermedad. En el caso de que se produzca la alteración de uno de estos genotipos (<i>rr</i> en la planta, <i>avr-</i> en el patógeno), se producirá una interacción compatible (+), en la que la planta no es capaz de reconocer específicamente al patógeno, y que causará el desarrollo de la enfermedad (tabla adaptada de Vivian y Gibbon, 1997).....	3
Tabla 2. Composición y preparación de 1 L de medio de germinación.....	11
Tabla 3. Composición y preparación de 1 L de medio de cultivo bacteriano LB agar.	12
Tabla 4. Composición y preparación de 1 L de medio de cultivo bacteriano King B líquido. ...	12
Tabla 5. Composición y preparación de 1 L de medio de cultivo bacteriano King B agar.....	14
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados como cebadores en los experimentos de qRT-PCR.....	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo zig-zag representativo de la inmunidad innata en plantas. En la fase I, los receptores transmembrana PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) de la planta reconocen elicitores químicos, MAMPs, DAMPs y PAMPs (*Microbe/Danger/Pathogen-Associated Molecular Patterns*, respectivamente), lo que desencadena la primera respuesta inmune PTI (*PAMP Triggered Immunity*). En la fase II, los patógenos exitosos liberan efectores que interfieren con la PTI, resultando en una susceptibilidad ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*). En la fase III, un efector o factor de avirulencia (*Avr*) es reconocido por una proteína R, activando la inmunidad ETI (*Effector Triggered Immunity*), una versión amplificada de PTI que suele desencadenar una respuesta hipersensible (HR, *Hypersensitive Response*) y muerte celular programada. Finalmente, en la fase IV, se produce una selección de patógenos que han perdido dicho efector o factor *Avr*, y que probablemente han ganado nuevos efectores, de forma que pueden suprimir la ETI, lo que origina una coevolución de las plantas con los patógenos para restaurar esta inmunidad (figura adaptada a partir de Jones y Dangl, 2006; Wiesel et al., 2014). 2

Figura 2. Representación de la base molecular de la resistencia de plantas a patógenos necrotrofos (parte superior) y biotrofos (parte inferior). En el primer caso, la resistencia es conferida por RLKs (*Receptor-Like Kinases*), defensinas, fitoalexinas y rutas de señalización de hormonas JA/ET (*Jasmonic Acid/ Ethylene*). En el segundo caso, la respuesta requiere dos niveles de resistencia: PTI (*PAMP Triggered Immunity*), y ETI (*Effector Triggered Immunity*). En PTI, la percepción de MAMPs, DAMPs y PAMPs (*Microbe/Danger/Pathogen-Associated Molecular Patterns*, respectivamente) por los PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) transmembrana da lugar a la activación de la cascada de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) y factores de transcripción *downstream*, que dan lugar a respuestas inmunes. En ETI, ocurre la interacción entre la proteína R de la planta y el efector del patógeno, como el efector tipo III liberado por los sistemas de secreción tipo III bacterianos (TTSS, *Type Three Secretion Systems*). Esta interacción causa generalmente una respuesta hipersensible (HR, *Hypersensitive Response*), a la vez que se activa la señalización dependiente de SA (*Salicylic Acid*), lo que conlleva la resistencia adquirida sistémica (SAR, *Systemic Acquired Resistance*). Figura adaptada de Zhang et al., 2013..... 5

Figura 3. Esquema del ciclo infeccioso de la bacteria *Pseudomonas syringae*. (a) Hojas de planta sana. (b) Agregación de bacterias alrededor de un tricoma sobre la superficie de una hoja sana. (c) Penetración de bacterias en estoma abierto. (d) Colonización de bacterias del apoplasto de la planta, seguida de multiplicación bacteriana en el apoplasto. (e) Necrosis y clorosis asociadas a la enfermedad (Xin y He, 2013)..... 6

Figura 4. Representación esquemática de la biosíntesis de terpenoides volátiles. Esta síntesis puede ocurrir por la vía citosólica del ácido mevalónico (MVA), o por la vía plastidial del metileritrol fosfato (MEP), rutas interconectadas mediante un exportador de isopentenil pirofosfato (IPP) desde el plástido hasta el citosol. Los compuestos volátiles aparecen remarcados en amarillo (Muhlemann Joëlle et al., 2014)..... 8

Figura 5. Mecanismos de reacción de monoterpene sintasas que dan lugar a monoterpene acíclicos El paso inicial de ionización del sustrato geranil difosfato es común a la formación de monoterpene cíclicos y, en algunos casos, los pasos hasta la formación del catión de linalilo

también pueden ser comunes. La formación de linalool, mircenol y (E)- β -ocimeno puede proceder del catión de geranilo o del catión de linalilo (Degenhardt et al., 2009)..... 9

Figura 6. Expresión relativa del gen *MTSI* en plantas de tomate RG y en líneas transgénicas, con el gen *MTSI* silenciado. En cada caso, se inoculan plantas con la solución sin la bacteria (Mock) y con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* (Inf). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de la qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica la proteína actina. Los niveles de expresión relativa corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 3 plantas independientes de un experimento representativo. El doble (**) y triple (***) asterisco es indicativo de que existe una significación estadística entre las plantas control y las transgénicas, con un *p-value* < 0,005 y un *p-value* < 0,001, respectivamente..... 18

Figura 7. Ratio de apertura estomática de plantas de tomate RG controles y transgénicas, con el gen *MTSI* silenciado, tras 24 horas de la infección con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto*. (A) Resultados del índice de apertura estomática. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 50 estomas correspondientes a 3 plantas independientes de un experimento representativo. El triple asterisco (***) es indicativo de que existe una significación estadística, con un *p-value* < 0,001, entre las plantas control y las transgénicas. (B, C y D) Imágenes correspondientes a estomas representativos de plantas controles y transgénicas de las líneas 2.1 y 7.1, respectivamente..... 20

Figura 8. Expresión relativa del gen *PRI* en plantas de tomate RG y en líneas transgénicas, con el gen *MTSI* silenciado. En cada caso, se inoculan plantas con la solución sin la bacteria (Mock) y con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* (Inf). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de la qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica la proteína actina. Los niveles de expresión relativa corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 3 plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) es indicativo de que existe una significación estadística entre las plantas control y las transgénicas, con un *p-value* < 0,05..... 21

Figura 9. Expresión relativa del gen *LEA* en plantas de tomate RG y en líneas transgénicas, con el gen *MTSI* silenciado. En cada caso, se inoculan plantas con la solución sin la bacteria (Mock) y con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* (Inf). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de la qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica la proteína actina. Los niveles de expresión relativa corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 3 plantas independientes de un experimento representativo. Se realizó un análisis estadístico de *t* de Student, pero no se observaron diferencias significativas. 22

Figura 10. Expresión relativa del gen *5CSI* en plantas de tomate RG y en líneas transgénicas, con el gen *MTSI* silenciado. En cada caso, se inoculan plantas con la solución sin la bacteria (Mock) y con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* (Inf). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de la qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica la proteína actina. Los niveles de expresión relativa corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 3 plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) es indicativo de que existe una significación estadística entre las plantas control y las transgénicas, con un *p-value* < 0,05..... 23

Figura 11. Expresión relativa del gen *TCI21* en plantas de tomate RG y en líneas transgénicas, con el gen *MTS1* silenciado. En cada caso, se inoculan plantas con la solución sin la bacteria (Mock) y con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* (Inf). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de la qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica para la proteína actina. Los niveles de expresión relativa corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 3 plantas independientes de un experimento representativo. Se realizó un análisis estadístico de *t* de Student, pero no se observaron diferencias significativas. 24

Figura 12. Crecimiento de la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* en hojas de planta de tomate RG controles y transgénicas, con el gen *MTS1* silenciado. Los resultados, obtenidos 24 horas después de la infección, se expresan como el logaritmo de las c.f.u. por cm² de hoja. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) es indicativo de que existe una significación estadística entre las plantas control y las transgénicas, con un *p-value* < 0,05..... 26

ABREVIATURAS

- ABA: Ácido Abscísico.
- Avr: Factor de avirulencia.
- AZI1: *Azelaic Acid Induced1*.
- c.f.u.: Unidades formadoras de colonias.
- COR: Coronatina.
- DAMPs: *Damage/Danger-Associated Molecular Patterns*.
- DEPC: Dietilpirocarbonato.
- DMAPP: Dimetilalil Pirofosfato.
- EFR: Receptor de EF-Tu.
- EF-Tu: Factor de elongación Tu.
- eLRR: *Extracelular Leucine-Rich Repeat*.
- ET: Etileno.
- ETI: *Effector-Triggered Immunity*.
- ETS: *Effector-Triggered Susceptibility*.
- FLS2: *Flagellin-sensitive 2*.
- GA: Ácido gentísico.
- HR: Respuesta hipersensible.
- hrp: *Hypersensitive-Response and Pathogenicity*.
- HSTs: *Host-Selective Toxins*.
- IPP: Isopentenil Pirofosfato.
- JA: Ácido jasmónico.
- JAZ: *Jasmonate ZIM-Domain*.
- JIP21: *Jasmonic-Induced Protein 21*.
- LEA: *Late Embryogenesis Abundant*.
- LOX: Lipooxigenasa.
- MAMPs: *Microbe-Associated Molecular Patterns*.
- MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases*.
- MEP: Fosfato de metileritritol.
- MTS1 (gen) / MTS1 (enzima): Monoterpeno sintasa 1.
- MVA: Ácido mevalónico.
- NB-LRR: *Nucleotide Binding site-Leucine Rich Repeat*.

O.D.: Densidad óptica.

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*.

PI: Inhibidores de proteinasas.

PRs: *Pathogenesis-Related Proteins*.

PRRs: *Pattern Recognition Receptors*.

PTI: *PAMP Triggered Immunity*.

Pto DC3000: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

pv: Patovar.

qRT-PCR: Transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa.

R: Gen de resistencia.

RG: Rio Grande.

RLKs: *Receptor-Like Kinases*.

RLPs: *Receptor-Like Proteins*.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SA: Ácido salicílico.

SAR: Respuesta sistémica adquirida.

SERK: *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*.

TCI21: *Tomato Chymotrypsin Inhibitor 21*.

TPSs: Terpeno Sintetasas.

TTSS: *Type Three Secretion Systems*.

VOCs: Compuestos orgánicos volátiles.

1 INTRODUCCIÓN

1.1. LA RESPUESTA DEFENSIVA DE PLANTAS

La exposición de las plantas a numerosos agentes ambientales, tanto bióticos como abióticos, puede afectar considerablemente a su desarrollo y supervivencia. Estas condiciones, que puede llegar a ser hostiles, sumadas a la naturaleza sésil de las plantas y a la ausencia de un sistema inmune adaptativo somático, han dado lugar a la necesidad de una respuesta defensiva por parte de los organismos vegetales (Spoel y Dong, 2012).

En referencia al estrés biótico, la gran diversidad de organismos a los que se enfrentan las plantas, que incluyen tanto herbívoros (Santamaria *et al.*, 2013) como microorganismos patógenos (Mehta *et al.*, 2008), ha originado una amplia variedad de respuestas en el mundo vegetal. De esta forma, el estudio de las interacciones planta-patógeno adquiere una gran relevancia desde ambos puntos de vista, dada la elevada capacidad de las plantas de evitar enfermedades, a pesar de las diferentes estrategias empleadas por los patógenos para tratar de evitarlas (Abramovitch y Martin, 2004).

En general, la respuesta defensiva de las plantas frente al ataque de los patógenos se desarrolla en dos etapas, en las cuales intervienen reacciones bioquímicas y barreras físicas o estructurales. En primer lugar, la resistencia constitutiva, también denominada defensa pasiva o general, constituye una barrera preexistente que resulta esencial para la supervivencia de la planta. Las estructuras en la superficie, como el grosor de la cutícula o de la pared celular, suponen barreras físicas que obstaculizan el ataque de los patógenos, pero su utilidad radica especialmente en la defensa ante animales fitófagos, pues la presencia de espinas o tricomas reduce su accesibilidad (Santamaria *et al.*, 2013). Por ello, la resistencia de las plantas a patógenos de tamaño mucho más reducido viene dada fundamentalmente a la presencia de sustancias, como exudados fungitóxicos o taninos, u otros factores que interfieren en el metabolismo del patógeno, como la ausencia en la planta de nutrientes para el patógeno o de receptores para sus toxinas (Agrios, 1995).

Esta primera línea defensiva de las plantas puede ser anulada por los propios patógenos; por ejemplo, mediante la secreción de enzimas, tales como cutinasas o pectinasas, los patógenos pueden degradar las barreras físicas presentes en la planta (Arie *et al.*, 2007). Por este motivo, las plantas presentan otro tipo de resistencia, denominada resistencia inducida, activa o adquirida, que a menudo determina si las plantas son resistentes o susceptibles a la infección (Almagro *et al.*, 2009). Esta resistencia implica modificaciones estructurales, como la formación de estructuras histológicas de defensa, y también respuestas químicas, como la inducción de la síntesis de fitoalexinas, que pueden desencadenar en ambos casos una reacción de hipersensibilidad (Agrios, 1995). Como se detallará más adelante, esta respuesta defensiva implica a su vez dos fases: una primera fase de percepción o reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que puede dar lugar a una inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI) o a una inmunidad desencadenada por efectores (ETI) en función de la especificidad del reconocimiento; y una segunda fase de señalización de la respuesta defensiva tras la transducción de la señal (Jones y Dangl, 2006).

1.1.1. Percepción del patógeno

1.1.1.1. Reconocimiento inespecífico: respuesta defensiva activada por PAMPs

La respuesta inmune primaria que se induce en la planta (PTI, *PAMP Triggered Immunity*) consiste en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), mediante la presencia de receptores transmembrana

de reconocimiento de patrón o PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) (Jones y Dangl, 2006), cuya activación despolariza la membrana, produciéndose un incremento del nivel de calcio en las células vegetales (Segonzac y Zipfel, 2011). Existen también otras dos formas de percepción de señales de peligro: el reconocimiento de DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*, también conocidos como *Danger-Associated Molecular Patterns*), *elicitors* endógenos generados a partir de las barreras estructurales de la propia planta por la acción de herbívoros o de enzimas líticas del patógeno, y que suelen aparecer en el apoplasto (Boller y Felix, 2009); y el reconocimiento de MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*), moléculas derivadas de microbios en general, incluyendo tanto microbios patógenos como no patógenos y saprófitos (Newman *et al.*, 2013), de forma que pueden considerarse que los PAMPs son un subgrupo de los MAMPs. Además, las plantas también son capaces de reconocer *elicitors* químicos (Figura 1) (Wiesel *et al.*, 2014).

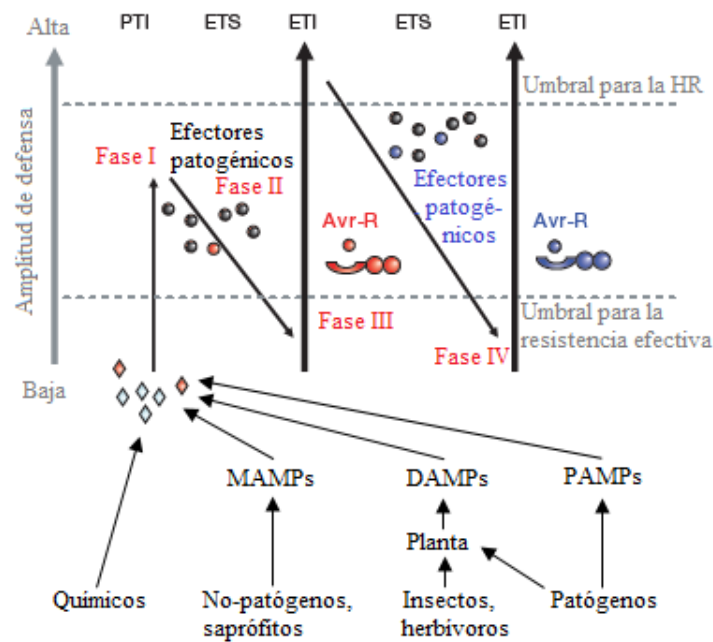


Figura 1. Modelo zig-zag representativo de la inmunidad innata en plantas. En la fase I, los receptores transmembrana PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) de la planta reconocen elicitores químicos, MAMPs, DAMPs y PAMPs (*Microbe/Danger/Pathogen-Associated Molecular Patterns*, respectivamente), lo que desencadena la primera respuesta inmune PTI (*PAMP Triggered Immunity*). En la fase II, los patógenos exitosos liberan efectores que interfieren con la PTI, resultando en una susceptibilidad ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*). En la fase III, un efector o factor de avirulencia (*Avr*) es reconocido por una proteína R, activando la inmunidad ETI (*Effector Triggered Immunity*), una versión amplificada de PTI que suele desencadenar una respuesta hipersensible (*HR*, *Hypersensitive Response*) y muerte celular programada. Finalmente, en la fase IV, se produce una selección de patógenos que han perdido dicho efector o factor *Avr*, y que probablemente han ganado nuevos efectores, de forma que pueden suprimir la ETI, lo que origina una coevolución de las plantas con los patógenos para restaurar esta inmunidad (figura adaptada a partir de Jones y Dangl, 2006; Wiesel *et al.*, 2014).

Se conocen un gran número de *elicitors* capaces de iniciar este tipo de respuesta. En el caso de la bacteria *Pto* DC3000, dos de los *elicitors* más estudiados son la flagelina, que induce la respuesta celular a partir de un péptido de 22 aminoácidos denominado flg22, y que se une al receptor FLS2; y el factor de elongación Tu (EF-Tu), que activa respuestas defensivas similares a flg22, y que es reconocido por EFR (Jones y Dangl, 2006). Estos receptores transmembrana

(PRRs), en general, son reguladores positivos de la inmunidad innata (Yang *et al.*, 2012), e incluyen quinasas (RLKs, *Receptor-Like Kinases*) y proteínas (RLPs, *Receptor-Like Proteins*); en el caso de FLS2 y EFR, son PRRs glicosiladas de tipo RLK (Zvereva y Pooggin, 2012), que requieren para su señalización quinasas de la subfamilia SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) (Segonzac y Zipfel, 2011).

Una vez los receptores reconocen los *elicitors* afines, se desencadena la inmunidad PTI, y se inicia una transducción de señales que, en el caso de los RLKs, se trata de una cascada de quinasas (como TPK1b en tomate, inducido tras la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) (Yang *et al.*, 2012). Finalmente, se activan una serie de mecanismos de defensa para lograr la resistencia a la infección, tales como la inhibición del crecimiento, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), la deposición de callosa, la generación de mensajeros secundarios, o la expresión de genes de defensa (Greeff *et al.*, 2012).

1.1.1.2. Reconocimiento específico: respuesta defensiva activada por efectores

A pesar de la efectividad general de la respuesta inmune innata, existen patógenos que presentan efectores capaces de interferir en la PTI y contribuir a la virulencia, lo que da lugar a la susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS, *Effector-Triggered Susceptibility*). Para contrarrestar la acción de estos efectores patogénicos específicos, las plantas han desarrollado una inmunidad desencadenada por efectores (ETI, *Effector-Triggered Immunity*), una respuesta PTI acelerada y amplificada que suele causar una respuesta hipersensible y muerte celular programada para evitar el ataque y progresión del patógeno a nivel local (Jones y Dangl, 2006).

Esta respuesta requiere la acción de proteínas de resistencia (R) de la planta para el reconocimiento intracelular de los efectores. La mayor parte de estas proteínas R pertenecen a la familia de proteínas con sitio de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (NB-LRR, *Nucleotide Binding site-Leucine Rich Repeat*), que a su vez presentan una subclasificación en función de su dominio N-terminal, y reconocen efectores tipo III liberados por los sistemas de secreción tipo III bacterianos (TTSS, *Type Three Secretion Systems*) (Zvereva y Pooggin, 2012). Sin embargo, estas proteínas R también pueden ser extracelulares (eLRR) (Chisholm *et al.*, 2006). En su co-evolución con la planta, es posible que el patógeno adquiriera efectores adicionales que le permitan suprimir esta inmunidad ETI a lo largo del proceso de selección natural, por lo que surgen nuevas especificidades R en la planta para restaurarla. De esta forma, puede considerarse que la amplitud final de la resistencia a la enfermedad corresponde a la suma total de PTI – ETS + ETI (Jones y Dangl, 2006) (Figura 1).

La interacción entre una proteína codificada por el gen de resistencia *R* y el factor de avirulencia codificado por el gen *Avr* del patógeno se conoce como interacción *gen-a-gen* (Flor, 1971). Esta interacción puede ser *incompatible*, en el caso de que se produzca un reconocimiento entre los factores *R* y *Avr*, de forma que la planta es resistente a la enfermedad; o *compatible*, en el caso de que no se produzca esta interacción, lo que implica susceptibilidad de la planta (Tabla 1).

Tabla 1. Modelo *gen-a-gen* (Flor, 1971). La interacción entre las proteínas codificadas por el gen de resistencia (*R*) de la planta y por el gen de avirulencia (*Avr*) del patógeno da lugar a una interacción de tipo incompatible (-), causante de la resistencia de la planta a la enfermedad. En el caso de que se produzca la alteración de uno de estos genotipos (*rr* en la planta, *avr* en el patógeno), se producirá una interacción compatible (+), en la que la planta no es capaz de reconocer específicamente al patógeno, y que causará el desarrollo de la enfermedad (tabla adaptada de Vivian y Gibbon, 1997).

Genotipo del patógeno	Genotipo del hospedador	
	<i>RR</i> o <i>Rr</i>	<i>rr</i>
<i>Avr</i> (<i>avr</i> ⁺)	-	+
<i>avr</i> (<i>avr</i> ⁻)	+	+

En la interacción incompatible, la resistencia se manifiesta mediante una muerte celular localizada e inhibición del crecimiento del patógeno (Chisholm *et al.*, 2006), pues el reconocimiento del gen *Avr* da lugar a una respuesta hipersensible (HR, *Hypersensitive Response*) (Vivian y Gibbon, 1997), propia de esta inmunidad desencadenada por efectores (ETI). Asimismo, esta respuesta hipersensible a nivel local origina la posterior activación de una resistencia sistémica adquirida (SAR, *Systemic Acquired Resistance*), que induce defensas en tejidos distales no infectados. Esta resistencia SAR, que también puede ser inducida por reconocimiento PAMP, requiere para su activación de la intervención de diversas hormonas de señalización de respuesta defensiva (apartado 1.1.2.) (Zvereva y Pooggin, 2012). En el caso de la interacción compatible, el patógeno es capaz de eludir la detección por parte de la planta hospedadora, permitiendo su proliferación y el desarrollo de la enfermedad (Chisholm *et al.*, 2006).

Un ejemplo bien estudiado de reconocimiento *gen-a-gen* es el que se produce entre la variedad Rio Grande (RG) de tomate, portadora del gen de resistencia *R*; y la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000), que posee el gen de avirulencia (*AvrPto*; raza 0) y, por tanto, origina una interacción incompatible y la resistencia a la enfermedad. Sin embargo, si esta misma variedad de tomate es infectada con la bacteria sin el gen de avirulencia (*avrPto*; raza 1), sí que se observan síntomas de la enfermedad (Tang *et al.*, 1996). La expresión de la proteína codificada por este gen *AvrPto* se encuentra regulada por un box de patogenicidad y respuesta hipersensible (*hrp*, *Hypersensitive-Response and Pathogenicity*) presente en su promotor (Pedley y Martin, 2003).

1.1.2. Señalización de la respuesta defensiva

Una vez se ha producido el reconocimiento, ocurre la transducción de señales y la señalización de la respuesta defensiva. A pesar de que, en algunos casos, se comparte la maquinaria de señalización empleada en ambas respuestas, PTI y ETI también presentan diferencias entre sí. Asimismo, se encuentran diferencias entre las rutas de señalización de patógenos necrotrofos y biotrofos (Figura 2). Respecto a los organismos necrotrofos, se requieren la producción de fitoalexinas (como camalexina) para contrarrestar el efecto de toxinas específicas del hospedador (HSTs, *Host-Selective Toxins*); defensinas para la permeabilización de la membrana del patógeno (entre otras funciones); y las hormonas jasmonato (JA, *Jasmonic Acid*) y etileno (ET, *EThylene*) para la señalización de la respuesta, cuya regulación es inversamente proporcional a la respuesta hipersensible: un aumento en los niveles de HR se asocian a la resistencia contra biotrofos, mientras que estos niveles disminuyen en la resistencia contra necrotrofos, de forma que altos niveles de HR activados en defensa contra biotrofos pueden originar la entrada de necrotrofos (Zhang *et al.*, 2013).

De esta forma, en organismos necrotrofos se produce únicamente una señalización propia de inmunidad PTI. Sin embargo, en el caso de la bacteria *Pto* DC3000, un organismo hemibiotrofo, se producen ambas respuestas (PTI y ETI), al igual que en biotrofos (Jones y Dangl, 2006), y predomina la señalización por ácido salicílico (SA, *Salicylic Acid*) sobre la de JA, ET y otras fitohormonas, como el ácido abscísico (ABA, *ABscisic Acid*) o el ácido géntísico (GA, *Gentisic Acid*), este último complementario al SA (Bellés *et al.*, 1999). Además, esta bacteria también produce toxinas que contribuyen a su patogenicidad (Glazebrook, 2005), como es el caso de la coronatina (COR), que mimetiza la acción del JA, el cual presenta una relación antagonista con el SA, de forma que favorece la infección (Zhao *et al.*, 2003) y contrarresta el cierre estomático promovido por ABA, cuya ruta de señalización se encuentra a su vez interconectada con SA (Melotto *et al.*, 2008).

En el caso de PTI, una vez los PRRs reconocen los PAMPs, MAMPs, DAMPs o *elicitors* químicos, se desencadena una cascada de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) y la activación *downstream* de factores de transcripción (como WRKY), que desencadena un gran número de respuestas: entrada de calcio (Ca²⁺), producción de ROS y otras moléculas señalizadoras, o inducción de señalización hormonal mediante SA, JA o ET (Bigeard *et al.*, 2015).

Respecto a la señalización de ETI, tras el reconocimiento de los efectores patogénicos por las proteínas R, la maquinaria inmunitaria empleada solapa en parte con la empleada en PTI, pero con algunas diferencias, como la duración de la actividad MAPK o los niveles hormonales. Estas diferentes rutas pueden desencadenar una HR o la activación de la SAR (Zhang *et al.*, 2013). En el caso de la interacción incompatible de tomate RG y *Pto* DC3000, el gen de resistencia *Pto* codifica una quinasa con especificidad serina-treonina que reconoce los efectores bacterianos AvrPto y AvrPtoB, lo que da lugar a la acumulación de transcritos de genes relacionados con patogenicidad (PR, *Pathogenesis-Related*) y diferentes respuestas contra el patógeno (HR, señalización hormonal...) (Pedley y Martin, 2003).

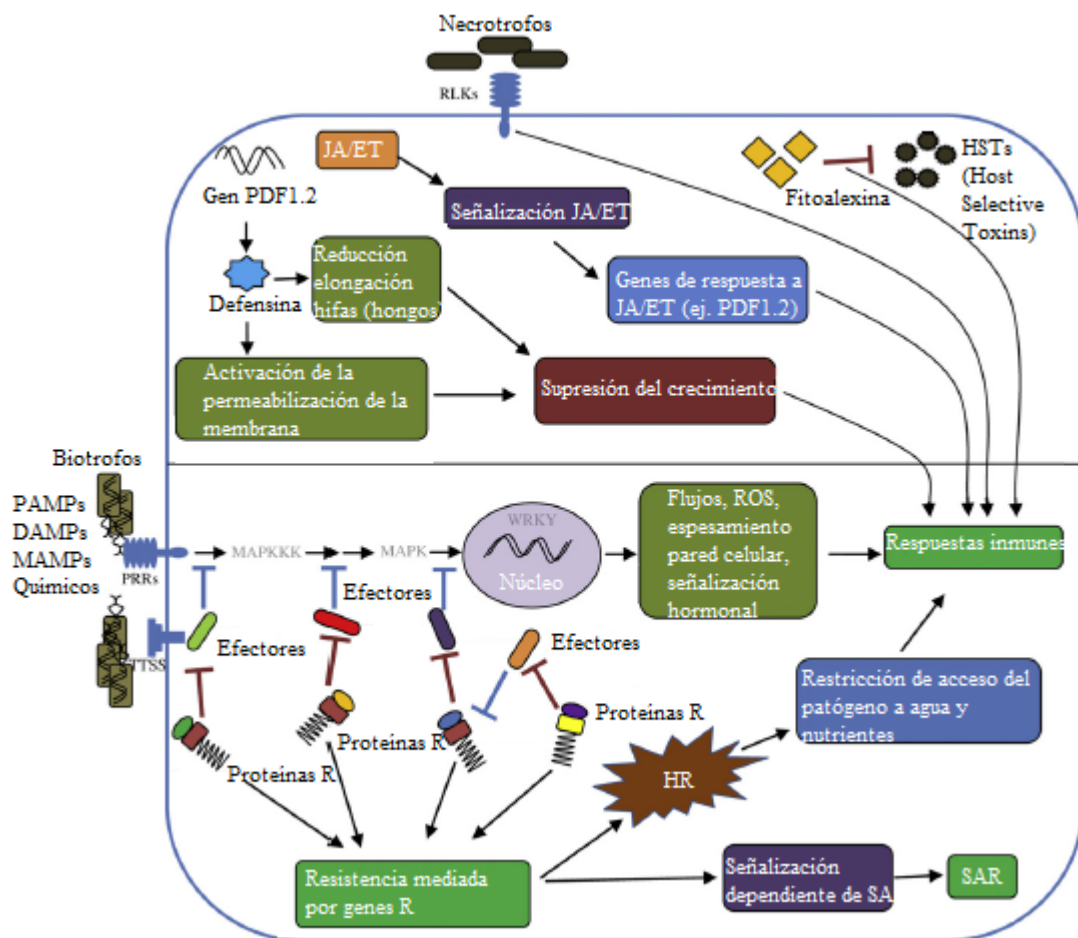


Figura 2. Representación de la base molecular de la resistencia de plantas a patógenos necrotrofos (parte superior) y biotrofos (parte inferior). En el primer caso, la resistencia es conferida por RLKs (Receptor-Like Kinases), defensinas, fitoalexinas y rutas de señalización de hormonas JA/ET (Jasmonic Acid/ Ethylene). En el segundo caso, la respuesta requiere dos niveles de resistencia: PTI (PAMP Triggered Immunity), y ETI (Effector Triggered Immunity). En PTI, la percepción de MAMPs, DAMPs y PAMPs (Microbe/Danger/Pathogen-Associated Molecular Patterns, respectivamente) por los PRRs (Pattern Recognition Receptors) transmembrana da lugar a la activación de la cascada de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) y factores de transcripción downstream, que dan lugar a respuestas inmunes. En ETI, ocurre la interacción entre la proteína R de la planta y el efector del patógeno, como el efector tipo III liberado por los sistemas de secreción tipo III bacterianos (TTSS, Type Three Secretion Systems). Esta interacción causa generalmente una respuesta hipersensible (HR, Hypersensitive Response), a la vez que se activa la señalización dependiente de SA (Salicilic Acid), lo que conlleva la resistencia adquirida sistémica (SAR, Systemic Acquired Resistance). Figura adaptada de Zhang *et al.*, 2013.

1.1.3. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 como patógeno de plantas

Las plantas de la familia *Solanaceae*, especialmente las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), constituyen un sistema modelo idóneo para el estudio de estas interacciones planta-patógeno, tanto por la gran variedad de patógenos que pueden atacar a estos cultivos (hongos, bacterias, virus y nemátodos); como por su relevancia agrícola a nivel mundial (Arie *et al.*, 2007). En este sentido, la respuesta defensiva frente a la bacteria *Pto* DC3000, causante de la llamada peca bacteriana del tomate, supone una referencia para el estudio de la susceptibilidad a enfermedades y señalización hormonal en plantas (Xin y He, 2013).

La bacteria Gram-negativa *Pseudomonas syringae* es un patógeno hemibiotrofo, aerobio estricto, de la subclase γ del filo Proteobacteria, que puede infectar numerosas especies de plantas. La elevada especificidad de cada cepa hacia sus hospedadores, que pueden ser unas pocas especies de plantas o unos pocos cultivares de la misma especie, ha dado lugar al agrupamiento de estas cepas en patovares (pv.), que permiten distinguir bacterias dentro de la misma especie con diferentes capacidades patogénicas (Hirano y Upper, 2000). Como consecuencia de su gran impacto económico, el patovar *tomato* DC3000 de *Pseudomonas syringae*, un derivado del patovar DC52 resistente a rifampicina (Xin y He, 2013), ha sido ampliamente estudiado, de forma que se conoce su capacidad de infección no solo a tomate, sino también a *Arabidopsis thaliana* y a algunas especies del género *Brassica* (Whalen *et al.*, 1991). La secuenciación del genoma de esta bacteria ha permitido comprender mejor las causas de su patogenicidad, hasta el punto de predecir la existencia de más de 200 genes relacionados con su virulencia (Buell *et al.*, 2003).

El ciclo infectivo de esta bacteria, que actúa a nivel local y no se distribuye a otras partes de la planta, se divide en dos fases interconectadas, tanto espacial como temporalmente. En la primera fase (fase epifítica), la bacteria alcanza la superficie de la planta sana (Figura 3). En la segunda (fase endofítica), una vez penetra en las hojas de la planta a través de heridas o aperturas naturales (como los estomas), la bacteria se multiplica en el apoplasto, y puede producir en el hospedador lesiones necróticas, a menudo rodeadas de halos cloróticos (Melotto *et al.*, 2008) causados por la toxina bacteriana COR, que a su vez inhibe el cierre estomático como parte de la estrategia de virulencia de la bacteria para facilitar la invasión de la planta (Pedley y Martin, 2003).

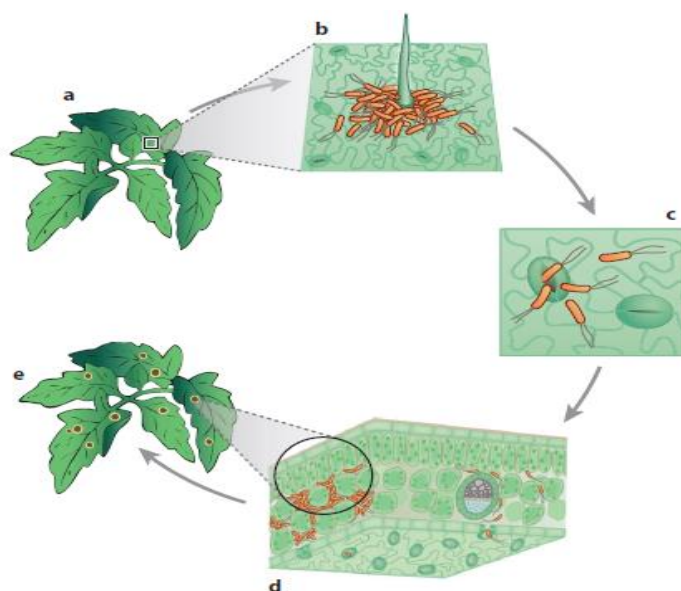


Figura 3. Esquema del ciclo infectivo de la bacteria *Pseudomonas syringae*. (a) Hojas de planta sana. (b) Agregación de bacterias alrededor de un tricoma sobre la superficie de una hoja sana. (c) Penetración de bacterias en estoma abierto. (d) Colonización de bacterias del apoplasto de la planta, seguida de multiplicación bacteriana en el apoplasto. (e) Necrosis y clorosis asociadas a la enfermedad (Xin y He, 2013).

1.2. PAPEL DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN LA INTERACCIÓN TOMATE-*PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TOMATO DC3000*

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, *Volatile Organic Compounds*) son líquidos lipófilos con elevadas presiones de vapor a temperatura ambiente y bajo peso molecular (por debajo de los 300 Da), lo que les permite atravesar libremente las membranas celulares y ser liberados a la atmósfera o al suelo. Se encuentran presentes en un gran número de familias de plantas, siendo cada especie capaz de sintetizar un conjunto único de ellos (Pichersky *et al.*, 2006).

Estos VOCs se pueden clasificar básicamente en tres clases principales: terpenoides o isoprenoides, fenilpropanoides o benzenoides, y derivados de ácidos grasos. Además, cabe destacar también la presencia de compuestos volátiles derivados de aminoácidos en aromas de flores y frutas, así como otros compuestos específicos de ciertos géneros y especies que no se clasifican en estas clases principales. Sin embargo, a pesar de su gran diversidad, la biosíntesis de la mayoría de ellos procede de unos pocos precursores del metabolismo primario (acetil-CoA, piruvato, fosfoenolpiruvato, y eritrosa 4-fosfato), a partir de cuatro vías biosintéticas: vía del shikimato, del fosfato de metileritritol (MEP), del ácido mevalónico (MVA), y de la lipooxigenasa (LOX) (Dudareva *et al.*, 2013).

Las funciones ecológicas de estos compuestos son muy diversas, requeridas para la adaptación al entorno y la supervivencia de las plantas. Entre estas funciones, encontramos la defensa contra herbívoros, ya sea mediante su repulsión o mediante la atracción sus depredadores, lo que implica la liberación de ciertos compuestos que constituyen un pequeño grupo de componentes conservados en la mayor parte de especies de plantas, como el monoterpeno linalool (Clavijo McCormick *et al.*, 2012); la síntesis de fitoalexinas (Dixon, 2001) y otros compuestos contra el ataque de patógenos; la señalización de las interacciones entre plantas, para la inducción de genes de defensa y emisión de VOCs en plantas vecinas; la resistencia a estreses abióticos, como luz o temperatura; o la atracción de polinizadores, para promover la reproducción y la facilitar la diversidad de las especies vegetales (Dudareva *et al.*, 2013).

Entre estas funciones, la emisión inducida diferencial de VOCs en la interacción entre las plantas de tomate RG y las cepas virulenta y avirulenta de la bacteria *Pto DC3000* ha permitido conocer las causas de la respuesta a esta infección. Entre estos VOCs, se incluyen monoterpenos hidroxilados, como el linalool, α -terpineol y 4-terpineol; ésteres como butanoato de (Z)-3-hexenilo, isobutanoato de (Z)-3-hexenilo y propanoato de (Z)-3-hexenilo; y un sesquiterpeno no identificado (López-Gresa *et al.*, 2017). Las funciones de estos compuestos pueden ser directas, si participan en la resistencia frente al patógeno (en este caso, por su actividad antimicrobiana), como ocurre con el α -terpineol; o indirectas, si inducen la expresión de genes implicados en la respuesta defensiva, como sucede al aplicar de manera exógena linalool, α -terpineol (Kabbas Piñango, 2015), propanoato de (Z)-3-hexenilo (Payá Montes, 2017), y butanoato de (Z)-3-hexenilo (Ozáez Martínez, 2017).

1.2.1. Rutas de biosíntesis de terpenos

Los terpenos forman la mayor y más diversa familia de compuestos naturales de plantas. Son hidrocarburos sin grupos funcionales, pero pueden sufrir alguna modificación química, en cuyo caso se denominan terpenoides. Su clasificación se basa en el número de unidades de isopreno, compuesto de cinco carbonos (C₅), razón por la que algunos autores también denominan isoprenoides a los terpenos. De esta forma, encontramos hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀), y politerpenos (más de C₄₀) (Connolly y Hill, 1991).

La biosíntesis de terpenos deriva de dos precursores C₅ interconvertibles: isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero alílico dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Figura 4). En plantas, estos

precursores son sintetizados a partir de las vías MEP y MVA, que son independientes y se encuentran compartimentadas. La primera (MEP) ocurre en los plástidos, y es responsable de la síntesis de hemi-, mono- y diterpenos, mientras que la segunda (MVA) se distribuye en el citosol, retículo endoplásmico y peroxisomas, y da lugar a sesquiterpenos (Muhlemann Joëlle *et al.*, 2014).

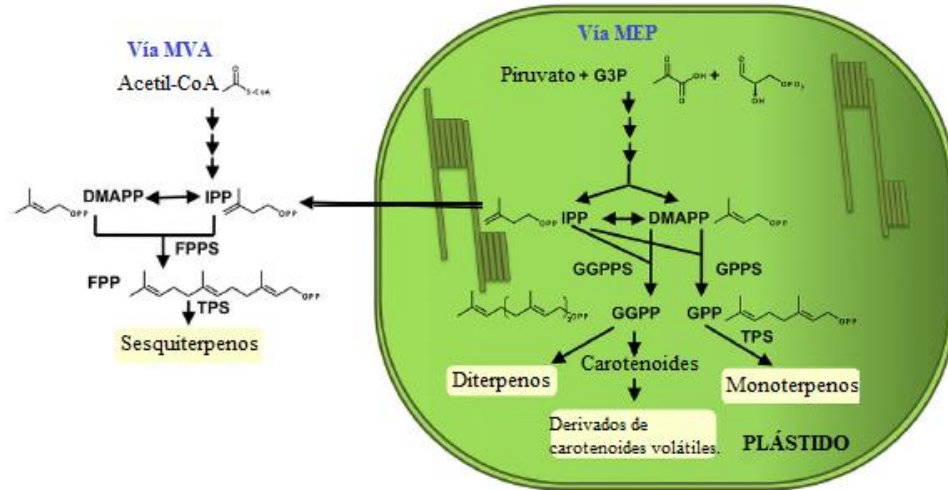


Figura 4. Representación esquemática de la biosíntesis de terpenoides volátiles. Esta síntesis puede ocurrir por la vía citosólica del ácido mevalónico (MVA), o por la vía plastidial del metileritrol fosfato (MEP), rutas interconectadas mediante un exportador de isopentenil pirofosfato (IPP) desde el plástido hasta el citosol. Los compuestos volátiles aparecen remarcados en amarillo (Muhlemann Joëlle *et al.*, 2014).

Por su baja masa molecular y carácter apolar, los monoterpenos son compuestos muy volátiles y la gran diversidad de éstos en plantas se debe a la acción de terpeno sintasas (TPSs) y otros enzimas capaces de modificar sus productos (Dudareva *et al.*, 2013). Los mecanismos de reacción de las monoterpenos sintasas se inician con la ionización del sustrato geranyl difosfato y, a partir de este punto, se pueden diferenciar las rutas que dan lugar a monoterpenos cíclicos y acíclicos. En el primer caso, se requiere la isomerización previa del catión geranilo a un intermediario linalílico capaz de ciclación, que dará lugar a un catión de α -terpinilo que experimentará posteriores ciclaciones secundarias. En la biosíntesis de monoterpenos acíclicos, los productos finales pueden sintetizarse a partir del catión geranilo o del catión de linalilo (Figura 5) (Degenhardt *et al.*, 2009).

Un ejemplo de la síntesis de monoterpenos acíclicos se encuentra en los genes de tomate *MTS1* y *MTS2* (*MonoTerpene Synthase 1* y *2*, respectivamente). La actividad *MTS2* da lugar a la síntesis de mircenol, mientras que *MTS1* es una linalool sintasa, cuyo producto (linalool) presenta gran importancia en la interacción entre tomate RG y *Pto DC3000* (van Schie *et al.*, 2007).

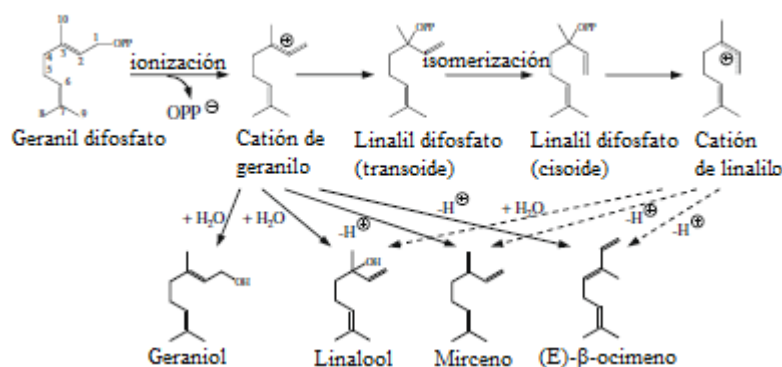


Figura 5. Mecanismos de reacción de monoterpeno sintasas que dan lugar a monoterpenos acíclicos. El paso inicial de ionización del sustrato geranil difosfato es común a la formación de monoterpenos cíclicos y, en algunos casos, los pasos hasta la formación del catión de linalilo también pueden ser comunes. La formación de linalool, mirceno y (E)-β-ocimeno puede proceder del catión de geranilo o del catión de linalilo (Degenhardt *et al.*, 2009).

1.2.2. Papel de los terpenos en la respuesta defensiva de plantas frente a patógenos

A pesar de que los terpenos están presentes en todos los organismos, son compuestos particularmente abundantes en plantas y algunos de ellos presentan funciones esenciales en el metabolismo vegetal como constituyentes de membrana que intervienen en su fluidez, pigmentos fotosintéticos, transportadores de electrones en la respiración, o transportadores de azúcares para el crecimiento y desarrollo, entre otras. Además, como metabolitos especializados, despliegan funciones ecológicas similares al resto de VOCs, como la participación en interacciones alelopáticas y planta-patógeno (Vranová *et al.*, 2013).

Algunas especies de plantas presentan terpenos con funciones defensivas directas frente a patógenos, como el caso de sesquiterpenos y diterpenos que actúan como fitoalexinas (Singh y Sharma, 2015), y se ha descrito monoterpenos que también presentan acción directa en la mejora de la resistencia frente a la bacteria *Pto* DC3000 (Riedlmeier *et al.*, 2017). Sin embargo, lo más frecuente en estos compuestos es su participación en funciones indirectas, mediante la señalización de un tipo de estrés en plantas vecinas para la activación de mecanismos de defensa, lo que se conoce como señalización entre plantas o *interplant communication* (Song *et al.*, 2010). En concreto, se ha demostrado que los monoterpenos pueden inducir respuestas defensivas mediante la producción de SA y acumulación de ROS, así como la activación de SAR (Riedlmeier *et al.*, 2017).

La señalización del cierre estomático en respuesta a infección bacteriana es uno de los principales mecanismos defensivos. Esta señalización, que se encuentra altamente regulada por ABA y, de manera indirecta, por SA, modulando la concentración endógena de ABA (Melotto *et al.*, 2008), requiere la acción de VOCs que permiten la comunicación entre plantas. Un ejemplo de la importancia de estos VOCs se encuentra en el linalool, monoterpeno sintetizado por la actividad MTS1, cuyo gen ha sido previamente estudiado en nuestro laboratorio, y se ha comprobado que su sobreexpresión induce el cierre estomático en plantas vecinas (Minguillón Campos, 2018).

Todos los mecanismos descritos a lo largo de esta introducción son una muestra de la importancia de los denominados metabolitos secundarios, en concreto los VOCs, en la respuesta defensiva de la propia planta y la comunicación interplanta. Así, la obtención de plantas transgénicas capaces de emitir constitutivamente VOCs expresados diferencialmente en respuestas a patógenos supone una futura herramienta biotecnológica, que permitiría conocer mejor los mecanismos moleculares implicados y desarrollar cultivos más eficientes.

OBJETIVOS²

En el presente Trabajo Final de Grado se plantea el estudio del papel defensivo del gen *MTS1* de la variedad de tomate RG frente a la bacteria avirulenta *Pto* DC3000. Para ello, se realizó previamente en nuestro laboratorio un estudio metabolómico para la identificación de VOCs expresados diferencialmente ante las infecciones compatible e incompatible de estas plantas con la bacteria, asociadas al establecimiento o la resistencia a la enfermedad, respectivamente. Entre los compuestos identificados, el presente estudio se centra en el monoterpeno linalool y su papel en la respuesta defensiva de plantas de tomate a la infección bacteriana. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- I. Estudio de la importancia de los monoterpenos en la capacidad de promover el cierre estomático de las plantas de tomate.
- II. Estudio del papel defensivo de *MTS1*, mediante el análisis de los niveles de expresión de diferentes genes implicados en la señalización de la respuesta defensiva de las plantas frente a la infección.
- III. Estudio de la inducción de la resistencia frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en las plantas transgénicas de tomate con el gen *MTS1* silenciado.

MATERIALES Y MÉTODOS 3

3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

En la realización del presente Trabajo Final de Grado se emplearon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad Rio Grande (RG), así como líneas derivadas de plantas modificadas genéticamente obtenidas en este mismo fondo genético, que silencian el gen monoterpeno sintasa 1 de tomate (*MonoTerpene Synthase 1; LeMTS1*).

3.1.1. Germinación de semillas

Las semillas fueron germinadas mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Para ello, se envolvieron separadamente las semillas de las diferentes líneas en mallas cerradas con hilo y se procedió a su desinfección mediante una serie de lavados. En primer lugar, cada malla fue sumergida durante 30 minutos en lejía comercial al 50%, a la que se añadieron unas gotas de detergente Tween 20 para romper la tensión superficial del agua. A continuación, se llevó a cabo una serie de tres lavados, sumergiendo las semillas en agua destilada autoclavada durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente, para eliminar de forma progresiva la lejía. Finalmente, las semillas fueron sembradas en botes autoclavados conteniendo 55 mL de medio de germinación (Tabla 2), suplementado con el antibiótico kanamicina en caso de tratarse de semillas transgénicas para su selección fenotípica. Todo este proceso se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar, manteniendo las condiciones de esterilidad.

Una vez sembradas las semillas, los botes se cerraron con cinta Micropore, para permitir el intercambio de gases sin llegar a contaminar el medio, y se dejaron a 24 °C en oscuridad durante un período de tiempo de entre 48 y 72 horas. Transcurrido este tiempo, permanecieron en cámaras de cultivo *in vitro* en presencia de luz, con un fotoperiodo de 16 horas de luz, hasta el desarrollo de los cotiledones, a las 2 semanas aproximadamente.

Tabla 2. Composición y preparación de 1 L de medio de germinación.

Compuesto	Cantidad
Medio MS (Murashige & Skoog)	4,4 g
Sacarosa	10 g
H ₂ O destilada	Hasta 1 L
Ajustar a pH = 5,7	
Agar	8 g
Autoclavar (121 °C, 15 minutos)	
Kanamicina (100 mg/mL)	1 mL

3.1.2. Condiciones de cultivo

Tras la expansión de los cotiledones, las plántulas fueron cultivadas en los invernaderos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), con unas condiciones de humedad relativa de entre 50 y 70%, temperatura entre 20 y 26 °C, y con un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). Para ello, cada plántula fue trasplantada a maceta de 12 cm de profundidad por 13 cm de diámetro inferior, que contenía una mezcla de turba y perlita al 50%,

y tras eliminar los restos del medio de germinación que pudiesen quedar en las raíces. Para facilitar su aclimatación, se empleó un vaso de plástico transparente para cubrir cada plántula durante unos 4 días aproximadamente. Las macetas fueron regadas manualmente con solución nutritiva de Hoagland.

3.2. MATERIAL MICROBIOLÓGICO Y PROCESO DE INFECCIÓN

La bacteria empleada para llevar a cabo la infección fue la cepa avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *AvrPto* (*Pto* DC3000 *AvrPto*), cuyo gen de avirulencia es reconocido por el gen de resistencia *Pto* de la planta, lo que da lugar a una interacción de tipo incompatible que permite la resistencia a la infección. La bacteria fue amablemente cedida por la Dra. Selena Giménez del Centro Nacional de Biotecnología (CNAB, Madrid).

3.2.1. Preparación del inóculo bacteriano

La bacteria, almacenada en glicerol a -80 °C, fue estriada en placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían 25 mL de medio LB agar (Pronadisa), al que se añadían los antibióticos indicados en la Tabla 3, incubada posteriormente a 24 °C durante 48 horas.

Una vez se observó el crecimiento de las colonias, se recogieron éstas con puntas de pipeta estériles y se inocularon en 3 mL de medio King B líquido (Tabla 4) en tubos Falcon de 50 mL. Las bacterias se dejaron crecer en agitación a 200-220 rpm y 28 °C. Transcurridas 24 horas, se transfirió 1 mL del cultivo a otro tubo Falcon de 50 mL con 14 mL de medio King B líquido, para promover un mayor crecimiento, y se dejó 24 horas en las mismas condiciones de agitación.

Tabla 3. Composición y preparación de 1 L de medio de cultivo bacteriano LB agar.

Compuesto	Cantidad
LB agar (Pronadisa)	35 g
H ₂ O destilada	Hasta 1 L
Autoclavar (121 °C, 15 minutos)	
Kanamicina (100 mg/mL)	0,5 mL
Rifampicina (10 mg/mL)	10 mL

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

Compuesto	Cantidad
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 minutos)	
MgSO ₄ 1M estéril	5 mL
Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL

El cultivo bacteriano resultante se centrifugó durante 15 minutos a 4000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el sedimento en 20 mL de MgCl₂ 10 mM estéril. Empleando un espectrofotómetro, se monitorizó el crecimiento bacteriano midiendo la absorbancia a 600 nm de una dilución 1:10, a partir de la cual se calcularon los volúmenes de cultivo bacteriano y MgCl₂ 10 mM requeridos para obtener un inóculo final con una densidad

óptica de 0,1 a 600 nm, que corresponde aproximadamente a 1×10^7 unidades formadoras de colonias por mililitro (c.f.u./mL) (López-Gresa *et al.*, 2017).

3.2.2. Infección bacteriana

La inoculación con la bacteria incompatible fue realizada por inmersión, una vez que las plantas presentaban la tercera y la cuarta hojas verdaderas lo suficientemente desarrolladas (esto es, aproximadamente a los 28 días después de su pase a maceta). Para ello, se sumergió la parte aérea de las plantas a infectar en una disolución de $MgCl_2$ 10 mM con 0,05 % de Silwet y cultivo bacteriano a una O.D. de 0,1 durante 30 segundos. Además, para cada línea (tanto transgénica como control) se prepararon también plantas control de la infección (denominadas *mock*), que fueron sumergidas en una solución estéril de $MgCl_2$ 10 mM con 0,05% de Silwet, aunque sin inóculo bacteriano, para asegurarse de que los síntomas son debidos a la infección bacteriana y no a daños producidos durante el procedimiento de inmersión (Scalschi *et al.*, 2012).

3.3. TOMA DE MUESTRAS

Los folíolos empleados en cada uno de los experimentos se escindieron de hojas jóvenes de tomate, concretamente de la tercera y cuarta hoja verdaderas de cada planta de tomate, siendo cada folíolo empleado para un experimento determinado. Para el análisis de la apertura estomática, se empleó siempre el folíolo del extremo, más distal al tallo (folíolo 'a'). Para el conteo bacteriano, se tomaron los folíolos de la zona intermedia (folíolos 'b' y 'c'). Finalmente, para los estudios de análisis de la expresión génica, los folíolos empleados fueron los más próximos al tallo (folíolos 'd' y 'e'). En este último caso, se recogieron las muestras en frascos de 20 mL (DELTALAB S.L.), se sumergieron inmediatamente en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.4. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

El conteo bacteriano consiste en el recuento de las unidades formadoras de colonias (c.f.u.) presentes por superficie de material vegetal infectado. Para llevarlo a cabo, con ayuda de un sacabocados se cortaron 3 discos de $0,95$ cm² de los folíolos indicados anteriormente, y se sumergieron en tubos Eppendorf que contenían 300 μ L de $MgCl_2$ 10 mM, de forma que cada tubo correspondía a una planta. Estos discos se trituraron en el homogeneizador *TissueLyser II* (Qiagen), tras introducir previamente perlas de vidrio en cada uno de los tubos. A partir de este paso, se trabajó en cabina de flujo laminar para evitar la contaminación por otros microorganismos. Se añadieron 700 μ L de $MgCl_2$ 10 mM a cada tubo, hasta un volumen final de 1 mL, se agitó la mezcla con vórtex hasta su completa homogeneización, y se realizaron diluciones seriadas 1:10.

Una vez realizadas las diluciones, se sembraron 100 μ L de 4 diluciones seriadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) en placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían medio King B agar (Tabla 5), y se extendieron con ayuda de pequeñas esferas de vidrio. Las placas fueron incubadas a 28 °C y, transcurridas 48 horas, se realizó el recuento de las colonias aisladas formadas en aquellas diluciones en las que el recuento era posible.

El número de unidades formadoras de colonias (c.f.u.) por cm² de tejido foliar se determinó con ayuda de una hoja de cálculo, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{c.f.u.}{cm^2} = \frac{\text{número de colonias} * 10 * 10^{\text{dilución}}}{\text{número de discos de tejido vegetal}}$$

Tabla 5. Composición y preparación de 1 L de medio de cultivo bacteriano King B agar.

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

3.5. MEDIDA DE LA APERTURA ESTOMÁTICA

Para el cálculo del *ratio* medio de apertura estomática de cada muestra, se obtuvieron moldes del envés de los foliolos asignados extendiendo una capa fina de adhesivo líquido nitrocelulósico, que se dejaba secar durante 5-10 minutos, se despegaba cuidadosamente con ayuda de unas pinzas, y se depositaba en tubos Falcon de 50 mL, de forma que cada tubo correspondía a una planta. A partir de los moldes obtenidos, se visualizaron los estomas mediante microscopía de campo claro, sin necesidad de ninguna tinción. Para ello, se cortaron secciones planas de cada molde, que se situaron en un portaobjetos, se hidrataron con agua destilada con ayuda de una pipeta Pasteur, y se cubrieron con un cubreobjetos. Se tomaron varias imágenes de cada muestra, de forma que pudiesen realizarse mediciones de, al menos, 50 estomas por cada una de las tres plantas analizadas de para cada línea. Estas imágenes fueron estudiadas posteriormente mediante el programa de análisis de imagen *Image J* (<https://imagej.nih.gov/ij/>), que permitió obtener el *ratio* medio de apertura estomática a partir de la medida del ancho y alto de cada estoma.

3.6. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE TRANSCRITOS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA

Para realizar el análisis cuantitativo de transcritos mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR), se partió de material vegetal previamente pulverizado a la temperatura del nitrógeno líquido con el homogeneizador *TissueLyser II* (Qiagen) y almacenado a -80 °C hasta su empleo.

3.6.1. Extracción de RNA total

La extracción de RNA de hojas de planta de tomate se realizó mediante el método del Trizol (Ambion Life Technologies) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. Para evitar la degradación del RNA, se mantuvieron las muestras en hielo durante todo el proceso, y todas las centrifugaciones se hicieron en microcentrífuga refrigerada a 4 °C. Al finalizar la extracción, el RNA fue almacenado a -20 °C, disuelto en un volumen final de 35 µL de H₂O tratada con DEPC (dietilpirocarbonato).

3.6.2. Cuantificación de RNA

Para determinar la cantidad de RNA extraído se empleó un espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), calibrado a cero con un blanco de H₂O DEPC. El cálculo de la concentración de RNA se realizó a partir de la absorbancia a 260 nm. El espectrofotómetro empleado muestra dos *ratios* de absorbancias a distintas longitudes de onda ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$), que permiten estimar el grado de pureza del ácido nucleico y la posible presencia de contaminantes.

3.6.3. Precipitación de RNA con cloruro de litio

Para la precipitación de RNA con LiCl, las muestras con RNA extraído y disuelto en 35 μL se llevaron a un volumen de 200 μL con H_2O DEPC. A continuación, se añadió un volumen (200 μL) de LiCl 6 M, y se dejaron las muestras en hielo durante 3 horas para la precipitación del RNA. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron 15 minutos a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se añadió un volumen (200 μL) de LiCl 3 M para lavar el precipitado, se volvió a centrifugar 15 minutos a 13000 rpm, se eliminó de nuevo el sobrenadante, y se redisolvió el sedimento en 44 μL de H_2O DEPC. Ambas centrifugaciones se realizaron a 4 $^\circ\text{C}$, para evitar la degradación de la muestra.

3.6.4. Tratamiento con DNasa

La eliminación del DNA, así como el paso anterior de precipitación, son necesarios para técnicas muy sensibles que requieran un alto grado de pureza del RNA, como es el caso de la PCR cuantitativa. Para ello, se utilizó el kit comercial TURBO DNase (Ambion Life Technologies). Para un volumen final de reacción de 50 μL , a los 44 μL de RNA obtenidos en el paso anterior se les añadió 5 μL de tampón de reacción (10x TURBO DNase Buffer) y 1 μL del enzima TURBO DNase (2 U/ μL). Posteriormente, las muestras se incubaron 30 minutos a 37 $^\circ\text{C}$, se añadió 5 μL de inactivador de DNasa, se incubó la mezcla 2 minutos a temperatura ambiente para detener la reacción, se centrifugaron las muestras 2 minutos a 12000 rpm y 4 $^\circ\text{C}$, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf.

El RNA precipitado y tratado con DNasa fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 descrito en 3.6.2. De esta forma, se comprobó que, a pesar de que la concentración de RNA era menor, la pureza de la muestra había aumentado, obteniéndose para todos los RNAs analizados valores comprendidos entre 1,8 y 2,0 para los *ratios* $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, lo cual es indicador de una buena calidad de la muestra.

3.6.5. Retrotranscripción

Para obtener cDNA a partir de las muestras 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 oligo(dT) 50 μM , 0,5 μL de enzima retrotranscriptasa (PrimeScript RT enzymeMix I), y el volumen de H_2O DEPC necesario para obtener los 10 μL de volumen final. La mezcla se incubó primero durante 15 minutos a 37 $^\circ\text{C}$, después durante unos segundos a 85 $^\circ\text{C}$ para inactivar el enzima RT, y finalmente se dispusieron las muestras en hielo, se diluyeron en una proporción 1:10 con H_2O DEPC hasta un volumen final de 100 μL , y se almacenaron a -20 $^\circ\text{C}$ hasta su empleo.

3.6.6. Amplificación cuantitativa de cDNA (PCR cuantitativa)

El ensayo de PCR cuantitativa se llevó a cabo con el reactivo de *SYBR* Green (Applied Biosystems). Se utilizó para ello una placa de 96 pocillos *MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate* (Applied Biosystems), añadiendo a cada pocillo 2 μL de cebadores, 0,4 μL de cDNA, 5,6 μL de H_2O DEPC, y 2 μL del reactivo *SYBR* Green PCR Master Mix. Se realizaron 3 repeticiones técnicas, tanto de las réplicas biológicas de cDNA como de los controles negativos (pocillos sin cDNA). La placa se selló cuidadosamente, sin dejar burbujas de aire, y se dio un pulso de centrifugación antes de introducirla en el equipo de PCR cuantitativa.

La amplificación fue monitorizada con el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (Life Technologies). Los resultados se analizaron con la versión 2.0.4 del software del mismo equipo.

Como control positivo del experimento, se utilizó el gen que codifica la proteína actina. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para cada uno de los genes analizados se recogen en la Tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados como cebadores en los experimentos de qRT-PCR.

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
<i>Actina</i>	5' CTAGGCTGGGTTCGCAGGAGATGATGC 3'	5' GTCTTTTTGACCCATACCCACCATCACAC 3'
<i>MTS1</i>	5' TGGTGGTCACCTTCAAGAGA 3'	5' GCCTGTGGTGGAAATAGGA 3'
<i>PR1</i>	5' CCGTGCAATTGTGGGTGTC 3'	5' GAGTTGCGCCAGACTACTTGAGT 3'
<i>LEA</i>	5' AGCAGATGTTGGAAAAGGAGC 3'	5' ATGCCTATGGTGGGGTATGTG 3'
<i>TC121</i>	5' ACTCGTCCTGTGCTTTGTCC 3'	5' CCCAAGAGGATTTTCGTTGA 3'
<i>5CSI</i>	5' ACCTTAATCTGGAGGCTTGAGAG 3'	5' AATTATTTACCCACCTGCCC 3'

3.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

Para la comparación entre dos tipos de muestras, en la que se diferencian medias de muestras con un tamaño poblacional reducido, el análisis estadístico empleado fue la prueba *t* de Student, con las herramientas estadísticas incluidas en el programa MS Excel de la *suite* Microsoft Office. Un valor $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo para todos los análisis.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se pretende confirmar el papel defensivo del gen *MTS1* de tomate, mediante la infección de plantas transgénicas de tomate de la variedad Rio Grande (RG) que silencian dicho gen, con la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000 *AvrPto*). El gen *MTS1* codifica una monoterpene sintasa (van Schie *et al.*, 2007) implicada en la síntesis de monoterpenos, tales como α -terpineol o linalool (Minguillón Campos, 2018), compuestos identificados diferencialmente en nuestro laboratorio en la infección de las plantas ante esta bacteria (López-Gresa *et al.*, 2017). De esta forma, para corroborar la importancia de dichos compuestos ante la infección, se llevó a cabo en las mencionadas plantas transgénicas el estudio de la susceptibilidad frente a la infección y del nivel de expresión de genes implicados en diferentes rutas de señalización de la respuesta defensiva.

4.1. SELECCIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS QUE SILENCIEN EL GEN *MTS1*

Para estudiar la posible función defensiva del gen *MTS1* tras una infección bacteriana, se procedió a la selección de las líneas transgénicas que presentan el gen silenciado, tanto fenotípicamente como comprobando los niveles de expresión relativa del gen. Además, se corroboró para cada línea si se encontraba o no en homocigosis, en cuyo caso todas las plantas derivadas del parental transformado deberían ser transgénicas.

En primer lugar, se calculó el porcentaje de plantas transgénicas para cada línea. Para ello, se observó fenotípicamente si la planta presentaba un crecimiento normal en medio de cultivo con kanamicina, o bien su desarrollo se veía afectado por la presencia del antibiótico en el medio. En el caso de que el desarrollo de la planta se encontrara afectado, esto es debido a que la planta no presenta la construcción empleada en la transformación para el silenciamiento del gen. Ninguna de las líneas presentó un porcentaje del 100 %, por lo que se puede afirmar que las líneas disponibles no son homocigotas. En el caso de las líneas empleadas (2.1 y 7.1), este porcentaje fue del 67,92 % en ambos casos. Por tanto, fue necesario realizar la selección fenotípica cada vez que se trató de emplear estas líneas.

Para la distinción fenotípica de las líneas, se observó una disminución en la elongación del tallo de la planta, así como la coloración púrpura de la raíz y la ausencia de raíces laterales. Estos efectos son consecuencia de la aplicación de kanamicina (100 mg/mL), basándose en los resultados empleados en estudios anteriores para esta concentración, de forma que la aplicación del antibiótico en plantas transgénicas y control permite su distinción, pues las plantas control carecen de la construcción introducida en las plantas transgénicas y, por tanto, presentan los efectos descritos. Sin embargo, los resultados de germinación fueron de alrededor del 50 % tanto en líneas transgénicas como en controles, por lo que, a diferencia de la supervivencia, la germinación no se vio afectada por la kanamicina (Ying *et al.*, 2008).

Una vez realizada la selección fenotípica, se llevó a cabo una primera comprobación de los niveles de expresión del gen *MTS1*, para conocer si estas líneas presentaban un silenciamiento respecto a las plantas control tras la infección con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto*, que da lugar a un aumento en la expresión (López-Gresa *et al.*, 2017). De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionaron las líneas 2.1 y 7.1 por su extremadamente baja expresión relativa, para el estudio de la función defensiva del gen ante la infección, mientras que la línea 5.1 fue descartada debido a que no presentaba silenciamiento.

El primer paso, previo al estudio de la apertura estomática y de la inducción de rutas de señalización, fue llevar a cabo la caracterización molecular de las líneas transgénicas seleccionadas anteriormente, mediante un estudio de la expresión génica de *MTS1* en plantas control y transgénicas tras 24 horas de la infección de sus hojas con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto*.

Los resultados aparecen representados en la Figura 6. Como se puede observar, las líneas transgénicas seleccionadas muestran una disminución significativa en los niveles de expresión relativa de *MTS1* en hojas, lo que permite corroborar el silenciamiento del gen en estas líneas.

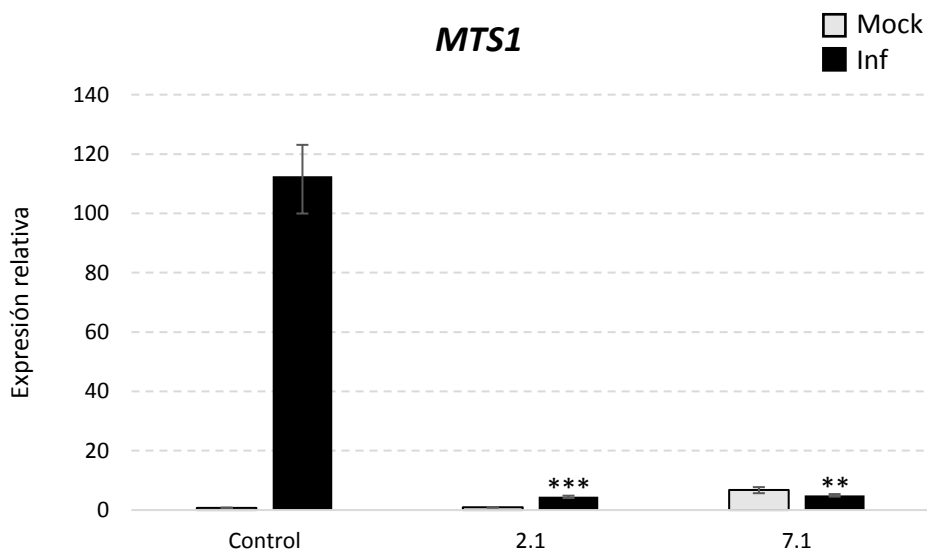


Figura 6. Expresión relativa del gen *MTS1* en plantas de tomate RG y en líneas transgénicas, con el gen *MTS1* silenciado. En cada caso, se inoculan plantas con la solución sin la bacteria (Mock) y con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* (Inf). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de la qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica la proteína actina. Los niveles de expresión relativa corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 3 plantas independientes de un experimento representativo. El doble (**) y triple (***) asterisco es indicativo de que existe una significación estadística entre las plantas control y las transgénicas, con un p -value $< 0,005$ y un p -value $< 0,001$, respectivamente.

El gen *MTS1* (*MonoTerpene Synthase 1*), también conocido como *TPS5* (*TerPene Synthase 5*), es una monoterpene sintasa perteneciente a la familia de sintasas de terpenos, muy diversificada en plantas (Chen *et al.*, 2011). Este gen fue descubierto en tomate (*LeMTS1*) como responsable de la síntesis de linalool en tricomas (van Schie *et al.*, 2007), y estudios posteriores corroboraron su función (Tian *et al.*, 2012) y mostraron su expresión también en el fruto (Cao *et al.*, 2014). Sin embargo, el gen no presenta transcritos en raíz, y su expresión es reducida en el tallo, pues la síntesis de linalool en estos órganos se debe a la acción de otra monoterpene sintasa (*MTS2*) (Falara *et al.*, 2011).

Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio demuestran que, además del linalool, *MTS1* es responsable también de la síntesis del monoterpene α -terpineol (Minguillón Campos, 2018), siendo ambos compuestos importantes en la resistencia frente a la infección de *Pto* DC3000 *AvrPto* en la interacción incompatible con tomate RG (López-Gresa *et al.*, 2017).

4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE *MTS1* EN LA APERTURA ESTOMÁTICA

Las líneas transgénicas seleccionadas para el estudio del papel defensivo de *MTS1* fueron empleadas para el análisis del comportamiento estomático, y posteriormente para el estudio de los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta defensiva. En referencia al análisis del efecto de los monoterpenos sintetizados por el enzima (α -terpineol y linalool) en la apertura estomática, se procedió a la medida del *ratio* de la apertura estomática en plantas transgénicas y control, una vez transcurridas 24 horas desde la infección (Minguillón Campos, 2018).

Los resultados obtenidos (Figura 7) evidencian que el silenciamiento del gen *MTS1* provocó una apertura estomática muy significativa, tanto en la línea 2.1 como en la 7.1, tras la infección de las plantas de tomate RG con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto*, que da lugar a una interacción de tipo incompatible (Tang *et al.*, 1996). De esta forma, el silenciamiento del gen afecta a la síntesis de α -terpineol y linalool, compuestos que se han identificado recientemente en nuestro laboratorio que contribuyen a la resistencia a la enfermedad (López-Gresa *et al.*, 2017). La disminución en la síntesis de estos compuestos causa un menor cierre estomático como respuesta ante la infección, lo que a su vez facilita la entrada de la bacteria (Melotto *et al.*, 2008).

El efecto de los mencionados monoterpenos en el cierre estomático ha sido estudiado en otras especies. Así, se conoce la relación entre la emisión de linalool y el comportamiento estomático en la especie *Pinus pinea* (Niinemets *et al.*, 2002), así como la dependencia de esta emisión con la respuesta a estrés en *Quercus ilex* (Staudt y Bertin, 2002) y *Rosmarinus officinalis* (Nogués *et al.*, 2015). Esta relación entre emisión, comportamiento estomático y respuesta a estrés también se ha observado para el α -terpineol en *Quercus ilex* (Copolovici *et al.*, 2005) y *Rosmarinus officinalis* (Nogués *et al.*, 2015).

El papel de diferentes VOCs, tales como los ésteres propanoato de (*Z*)-3-hexenilo e isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo, en el comportamiento estomático de la interacción de plantas de tomate RG con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* ha sido descrito recientemente en nuestro laboratorio (Payá Montes, 2017). En concreto, se conoce que el α -terpineol interviene en esta respuesta defensiva y en la señalización entre plantas (Kabbas Piñango, 2015) y que, al igual que el linalool, interviene en el comportamiento estomático, como se observa al sobreexpresar el gen *MTS1* y comprobar el cierre estomático por la emisión constitutiva de ambos volátiles (Minguillón Campos, 2018).

Respecto a la señalización hormonal del comportamiento estomático, se conocen diversas fitohormonas implicadas en la respuesta de los estomas ante diferentes tipos de estrés. Entre ellas, el ácido abscísico (ABA) es el mejor estudiado, y es conocida su interacción con el ácido jasmónico (JA) para promover el cierre estomático en *Arabidopsis* (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013). Esta señalización por JA es dependiente de la síntesis de linalool, por lo que se puede correlacionar la mayor apertura estomática y menor síntesis de linalool con unos niveles menores de estas hormonas (Taniguchi *et al.*, 2013). Además, se conocen también hormonas implicadas en la apertura estomática, como auxinas, citoquininas o etileno (ET), aunque en este último caso puede actuar como regulador positivo tanto de la apertura como del cierre estomático, en función del tejido y las condiciones (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013).

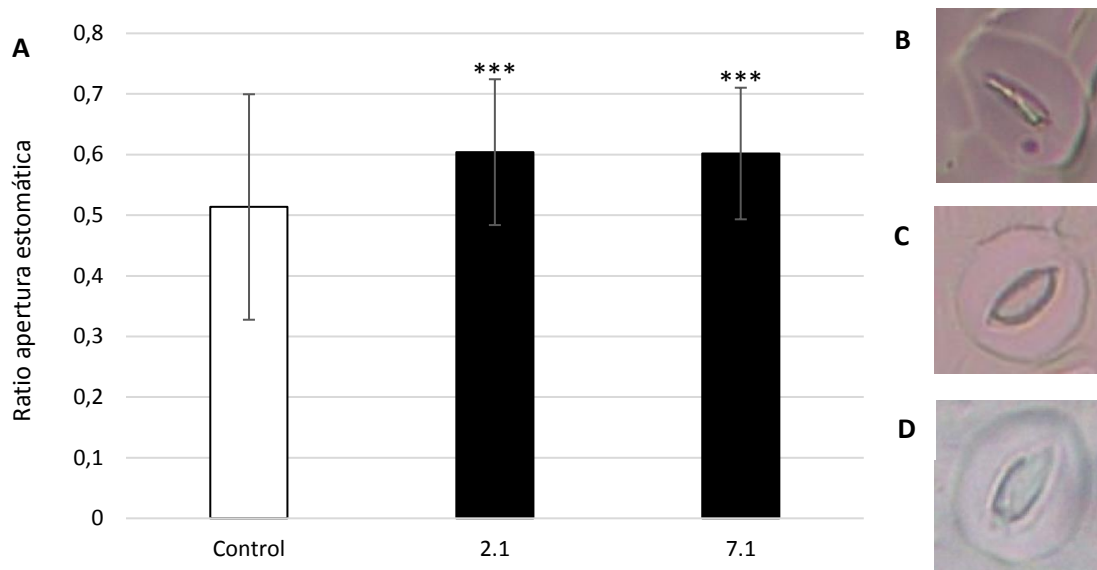


Figura 7. Ratio de apertura estomática de plantas de tomate RG controles y transgénicas, con el gen *MTS1* silenciado, tras 24 horas de la infección con la bacteria *Pto DC3000 AvrPto*. (A) Resultados del índice de apertura estomática. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 50 estomas correspondientes a 3 plantas independientes de un experimento representativo. El triple asterisco (***) es indicativo de que existe una significación estadística, con un p -value $< 0,001$, entre las plantas control y las transgénicas. (B, C y D) Imágenes correspondientes a estomas representativos de plantas controles y transgénicas de las líneas 2.1 y 7.1, respectivamente.

4.3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA RESPUESTA DEFENSIVA

Una vez conocido el efecto del silenciamiento de *MTS1* en la apertura estomática, se estudió la inducción de genes, entre cuyas acciones se incluye el propio comportamiento estomático.

4.3.1. Inducción de la ruta de señalización del ácido salicílico

La inducción de rutas de señalización implicadas en la respuesta defensiva requiere la regulación de diversas fitohormonas, tales como el ácido salicílico (SA), el ácido abscísico (ABA), el ácido jasmónico (JA) o el etileno (ET). Se ha empleado *PR1* como gen marcador de la ruta dependiente de SA. Los niveles de expresión de este gen tras 24 horas de infección de las plantas de tomate RG con la bacteria *Pto DC3000 AvrPto* aumentaron en todos los casos, como se muestra en la Figura 8, destacando que este incremento de la expresión de *PR1* fue entre cinco y diez veces superior en plantas transgénicas con respecto a plantas control infectadas con la bacteria.

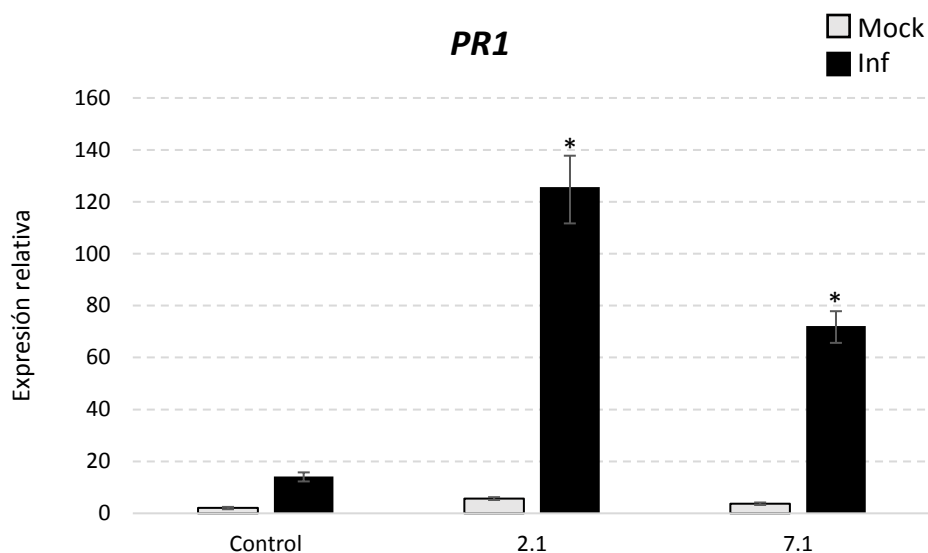


Figura 8. Expresión relativa del gen *PR1* en plantas de tomate RG y en líneas transgénicas, con el gen *MTS1* silenciado. En cada caso, se inoculan plantas con la solución sin la bacteria (Mock) y con la bacteria *Pto DC3000 AvrPto* (Inf). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de la qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica la proteína actina. Los niveles de expresión relativa corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 3 plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) es indicativo de que existe una significación estadística entre las plantas control y las transgénicas, con un *p-value* < 0,05.

El gen *PR1* pertenece a la familia de genes relacionados con la patogénesis (*Pathogenesis-Related, PR*), identificados inicialmente en tabaco. Estos genes son, entre otros, responsables de la aparición de la respuesta sistémica adquirida (SAR, *Systemic Acquired Resistance*) en la planta hospedadora tras la infección por diversos tipos de patógenos, como virus, viroides, hongos y bacterias (van Loon, 1985). No se conoce bien el significado biológico de la proteína PR1, pero está muy conservada en plantas y su expresión se dispara en una variedad muy grande de situaciones de estrés, por lo que se considera un buen marcador de patogénesis (Vera *et al.*, 1989). En el caso de la interacción entre tomate RG y *Pto DC3000*, se ha descrito que *PR1* es expresado a las 24 horas de producirse la infección de plantas de tomate con esta bacteria (López-Gresa *et al.*, 2011), y que la resistencia mediada por *Pto* requiere una vía mediada por SA, principalmente la ruta mediada por NPR1 y los factores de transcripción TGA1a y TGA2.2. (Ekengren Sophia *et al.*, 2003), aunque se ha encontrado alguna cepa de *Pseudomonas syringae* cuya resistencia mediada por SA es independiente de NPR1 (Clarke *et al.*, 2000).

Por tanto, *PR1* constituye un marcador de gran utilidad para conocer el papel de los monoterpenos en la inducción de la resistencia a la bacteria, como demuestran estudios realizados en *Arabidopsis* en los que la supresión de la biosíntesis y la emisión de estos monoterpenos redujo la capacidad de las plantas infectadas de desencadenar la SAR en la propia planta y en plantas vecinas (Riedlmeier *et al.*, 2017).

De esta forma, los resultados obtenidos (Figura 8) muestran el aumento de la expresión de *PR1* en plantas transgénicas respecto a las plantas control, causado por la infección con la bacteria *Pto DC3000*. Estos resultados permiten corroborar que el silenciamiento de *MTS1* (Figura 6) da lugar de manera indirecta a la apertura estomática (Figura 7), y que estos valores concuerdan con los niveles de expresión de *PR1* inducidos por la infección. Además, la síntesis de ABA, implicado en el cierre estomático, también podría verse comprometida por este silenciamiento. Por tanto, en esta interacción incompatible, la inhibición en la síntesis de monoterpenos implicados en la

resistencia da lugar a un aumento de los niveles de *PRI*, pues la cantidad de bacteria en la planta hospedadora aumenta y se activa dicha ruta de señalización como respuesta defensiva por parte de la planta.

4.3.2. Silenciamiento de la ruta de señalización del ácido abscísico

Para la evaluación de la respuesta defensiva mediada por ABA, hormona de naturaleza terpenoide cuya síntesis podría verse alterada al silenciar *MTSI*, se emplearon como genes marcadores *LEA* y *5CSI*. Como se observa en la Figura 9, los niveles de expresión del gen *LEA* tras 24 horas de la infección de las plantas de tomate RG con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* disminuyeron en las plantas transgénicas.

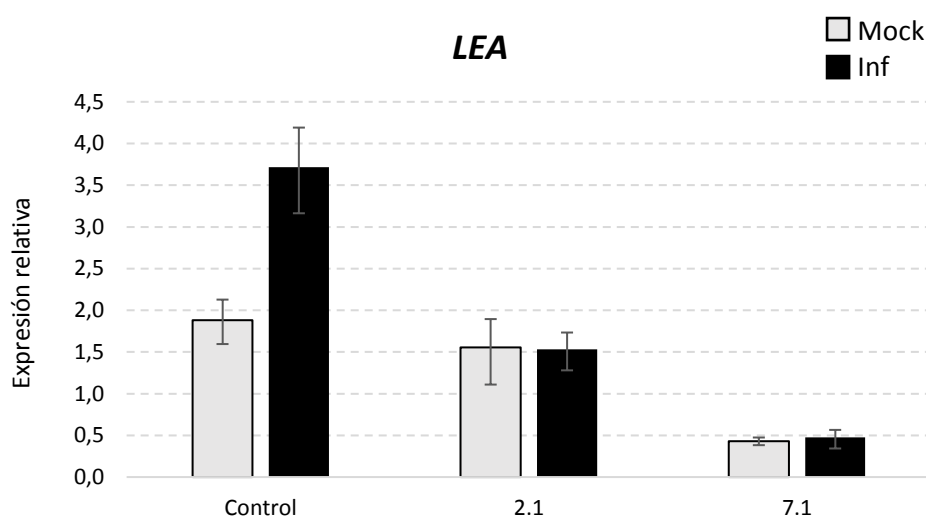


Figura 9. Expresión relativa del gen *LEA* en plantas de tomate RG y en líneas transgénicas, con el gen *MTSI* silenciado. En cada caso, se inoculan plantas con la solución sin la bacteria (Mock) y con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* (Inf). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de la qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica la proteína actina. Los niveles de expresión relativa corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 3 plantas independientes de un experimento representativo. Se realizó un análisis estadístico de *t* de Student, pero no se observaron diferencias significativas.

Las proteínas *LEA* (*Late embryogenesis abundant*) constituyen un grupo diverso de polipéptidos, de elevado peso molecular, acumuladas durante la embriogénesis tardía e inducidas por ABA. Fueron descubiertas por primera vez en algodón (Dure *et al.*, 1981), y se ha descrito que algunas de estas proteínas están implicadas en la tolerancia al estrés hídrico resultante de la desecación y el choque por frío, de forma que actúan como chaperonas moleculares, es decir, evitan la agregación enzimática ante tales condiciones de estrés (Goyal *et al.*, 2005). Adicionalmente, pueden desempeñar otras funciones, como la estabilización de membranas (Tolleter *et al.*, 2010).

Se conocen genes *LEA* de numerosos géneros de plantas, que participan en las respuestas al estrés abiótico, como sucede en *Arabidopsis*, *Oryza* o *Populus*. Además, estos genes también participan en la maduración de la semilla (Ling *et al.*, 2016), e incluso sus respectivas proteínas presentan actividad antimicrobiana en algunos casos, y su activación está dominada por la acción de ABA, por lo que se puede afirmar que los genes *LEA* son un buen marcador de los niveles de expresión de esta fitohormona (Liu *et al.*, 2013). En el caso del tomate, se han identificado 27 genes *LEA*, en los cuales se han localizado secuencias *upstream* relacionadas con elementos de regulación en respuesta a ABA (Cao y Li, 2015).

El gen *5CS1* pertenece a la familia de genes encargados de la expresión de Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintasas, inducidos en respuesta de diferentes estreses abióticos, como sequía, frío o salinidad; o ante la aplicación exógena de ABA, de forma que también puede ser empleado como marcador de esta hormona. La presencia de estos genes ha sido estudiada en diversas especies, como *Arabidopsis thaliana* (Sun *et al.*, 2014), arroz (Sripinyowanich *et al.*, 2013) o tomate, siendo sus patrones de expresión variables en función del tejido (González-Guzmán *et al.*, 2014). Los niveles de expresión alcanzados para este gen en plantas de tomate que silencian *MTS1* aparecen representados en la Figura 10.

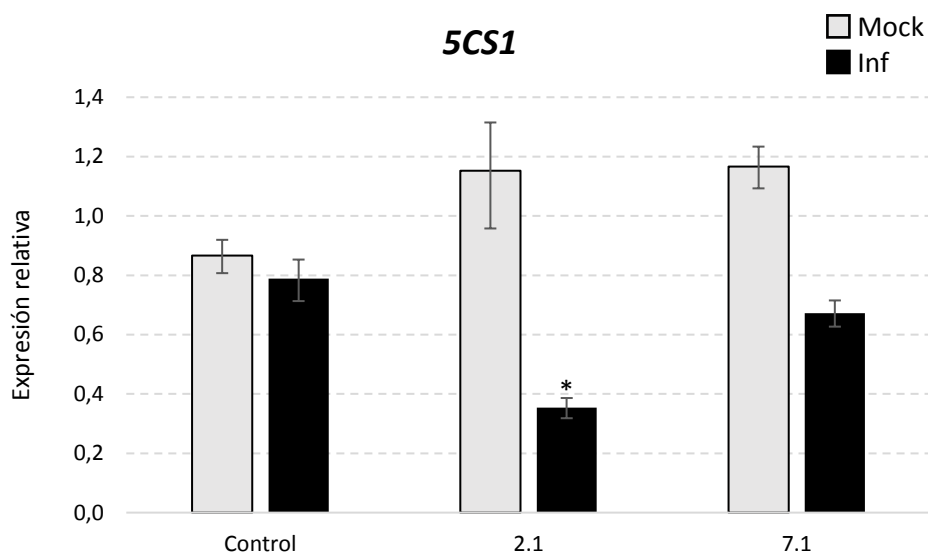


Figura 10. Expresión relativa del gen *5CS1* en plantas de tomate RG y en líneas transgénicas, con el gen *MTS1* silenciado. En cada caso, se inoculan plantas con la solución sin la bacteria (Mock) y con la bacteria *Pto DC3000 AvrPto* (Inf). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de la qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica la proteína actina. Los niveles de expresión relativa corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 3 plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) es indicativo de que existe una significación estadística entre las plantas control y las transgénicas, con un *p-value* < 0,05.

En referencia a ABA, su contribución a la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad varía en función del tipo de patógeno, y su respuesta tiene lugar en tres fases. En el caso de bacterias, la primera fase consiste en el cierre estomático, la segunda en la supresión de la deposición de callosa inducida por la bacteria mediante componentes de su ruta de señalización, y la tercera en la interacción antagonista con el SA (Ton *et al.*, 2009). En este último caso, estudios acerca de la interacción entre tomate y *Pto DC3000* muestran que la aplicación de ABA disminuye los niveles de SA, y que un aumento de los niveles de expresión de *LEA* viene correlacionado con una disminución de los de *PRI* (Kusajima *et al.*, 2017). Además, junto a esta regulación negativa de la biosíntesis de SA, se produce también la de ácido gantísico (GA), molécula que actúa como señal inducida por patógenos adicionalmente a SA y participa en su regulación (Bellés *et al.*, 1999), lo que confirma el efecto antagonista entre *LEA* y *PRI* (Alonso-Ramírez *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con estas observaciones previas. Así, la disminución de los niveles de ABA en plantas transgénicas (Figuras 9 y 10) se relaciona con un menor cierre estomático (Figura 7) y un aumento en los niveles de expresión de *PRI*, marcador de SA (Figura 8), como consecuencia de la infección por la bacteria *Pto DC3000 AvrPto*.

4.3.3. Silenciamiento de la ruta de señalización del ácido jasmónico

El papel de las rutas reguladas por JA y ET está asociado a la respuesta defensiva contra patógenos necrotrofos, a diferencia del SA, que regula rutas relacionadas con la defensa contra biotrofos y hemibiotrofos (Zhang *et al.*, 2013). En referencia al JA, los niveles de esta fitohormona se evaluaron mediante el gen marcador *TCI21*, cuya expresión relativa transcurridas 24 horas de la infección con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* fue menor en plantas transgénicas que en las plantas control (Figura 11).

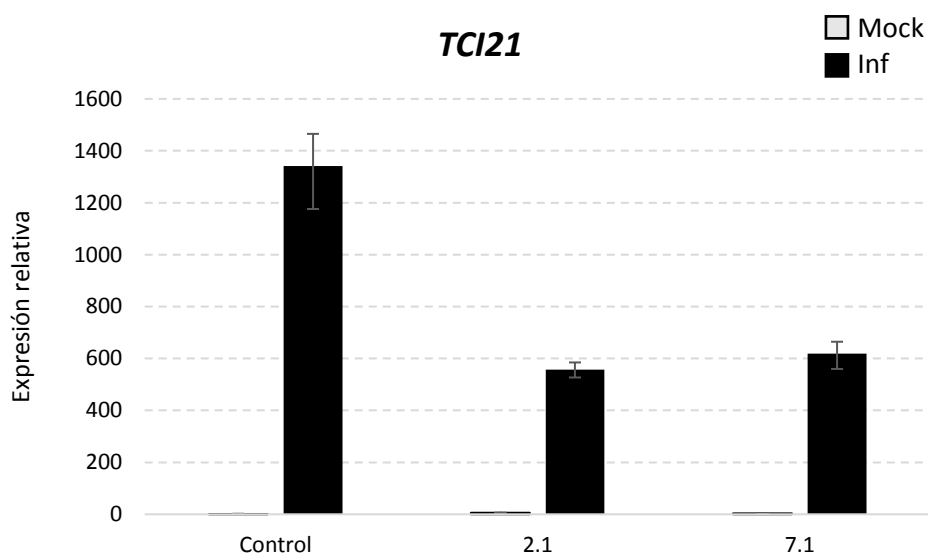


Figura 11. Expresión relativa del gen *TCI21* en plantas de tomate RG y en líneas transgénicas, con el gen *MTS1* silenciado. En cada caso, se inoculan plantas con la solución sin la bacteria (Mock) y con la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* (Inf). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de la qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica para la proteína actina. Los niveles de expresión relativa corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 3 plantas independientes de un experimento representativo. Se realizó un análisis estadístico de *t* de Student, pero no se observaron diferencias significativas.

El gen *TCI21* (*Tomato Chymotrypsin Inhibitor 21*), también conocido como *JIP21* (*Jasmonic-Induced Protein 21*), da lugar a una proteína que actúa como inhibidora de quimotripsina, perteneciente a la familia de inhibidores de serín-proteinasas. Este gen presenta en su promotor un *box* de metil jasmonato (TGACT), compuesto derivado del JA que da lugar a la inducción de elevados niveles de expresión del gen en hojas de planta de tomate, por lo que se trata de un buen indicador de la respuesta a JA (Lisón *et al.*, 2006).

La activación de la ruta de señalización de JA en la interacción entre tomate y *Pto* DC3000 *AvrPto* es debida a la producción por parte de la bacteria de coronatina, análogo del metil jasmonato. Esta fitotoxina es requerida para la manifestación de los síntomas de virulencia y el crecimiento de la bacteria, y puede suprimir respuestas tempranas por parte de la planta durante la infección, además de inhibir el cierre estomático (Melotto *et al.*, 2008). Para ello, requiere de la regulación por parte del JA, como se observa en estudios previos donde esta infección da lugar a la sobreexpresión de proteínas JAZ (*Jasmonate ZIM-Domain*), que inducen la sobreexpresión de una serie de genes que activan la respuesta defensiva regulada por esta hormona (Ishiga *et al.*, 2013).

El JA, asociado a la defensa contra necrotrofos, presenta un papel antagonista al SA en la señalización de la respuesta defensiva frente a estreses bióticos y abióticos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011), como la expresión de genes de inhibidores de proteinasas (PI, *Proteinase Inhibitors*) o

la activación de la respuesta sistémica a largas distancias. Su ruta de señalización está asociada con la de auxinas (Changbao *et al.*, 2005) y la del ABA, como muestran estudios realizados en la interacción entre *Arabidopsis* y *Pseudomonas syringae* (Fan *et al.*, 2009), aunque, en este último caso, la relación también puede ser antagonista, en función del tipo de estrés (Anderson *et al.*, 2004). Además, en referencia a la interacción entre tomate y *Pto* DC3000, se ha demostrado la importancia del JA en la inducción de linalool para la respuesta frente a esta bacteria en arroz (Taniguchi *et al.*, 2013), así como la acción antagonista de JA con la ruta de señalización mediada por SA, que resulta en la represión del gen *PRI* (Zhao *et al.*, 2003).

Los resultados mostrados en la Figura 11 corroboran estas relaciones entre las diferentes fitohormonas, pues el silenciamiento de *MTSI* (Figura 6) da lugar a menores valores de linalool presente en la planta, lo que conlleva menores niveles de expresión de genes marcadores de JA. Esta reducción de JA se relaciona con los menores niveles de genes marcadores de la ruta de señalización de ABA (Figuras 9 y 10) y mayores niveles de los de SA (Figura 8), lo cual viene asociado a un menor cierre estomático (Figura 7).

4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE *MTSI* EN LA RESISTENCIA FRENTE A LA INFECCIÓN DE LA BACTERIA AVIRULENTE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TOMATO* DC3000

El estudio de la resistencia de plantas transgénicas de tomate RG, con el gen *MTSI* silenciado, frente a la infección de *Pto* DC3000 *AvrPto*, se llevó mediante el conteo bacteriano en hojas de tomate controles y transgénicas 24 horas después de la infección. El objetivo es comprobar si el aumento de la apertura estomática y la variación en los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta defensiva se asocia con una mayor tasa de infección.

Como se observa en la Figura 12, la cantidad de unidades formadoras de colonias (c.f.u.) presente en las hojas de plantas transgénicas tras la inoculación parece ser mayor que en plantas control sin el gen *MTSI* silenciado, aunque las diferencias obtenidas para la línea 2.1 no fueron significativas.

La identificación de metabolitos implicados en la resistencia de plantas de tomate presenta una gran relevancia para el estudio de sus interacciones con diferentes tipos de patógenos (López-Gresa *et al.*, 2009). Entre estas interacciones, la respuesta defensiva de las plantas de tomate RG a la bacteria *Pto* DC3000 *AvrPto* viene asociada a la producción de diferentes VOCs, algunos de los cuales son monoterpenos sintetizados por el enzima codificado por el gen *MTSI* (López-Gresa *et al.*, 2017). De esta forma, se ha descrito que la supresión de la biosíntesis de monoterpenos aumenta la cantidad de bacteria (c.f.u./cm²) en la planta (Riedlmeier *et al.*, 2017), y su sobreproducción podría reducir estos niveles tanto en la propia planta como en plantas vecinas (Minguillón Campos, 2018).

A partir de los resultados obtenidos, se puede confirmar el papel de los monoterpenos como VOCs con un papel defensivo en las plantas, ya que el silenciamiento de *MTSI*, uno de los genes responsables de su biosíntesis (Figura 6), da lugar a una mayor susceptibilidad de la planta frente a la infección. Esta susceptibilidad se puede comprobar al medir la cantidad de bacteria en las hojas infectadas (Figura 12) y el menor cierre estomático (Figura 7), así como la inducción y represión de las diferentes rutas de señalización patogénicas en plantas estudiadas en el presente trabajo.

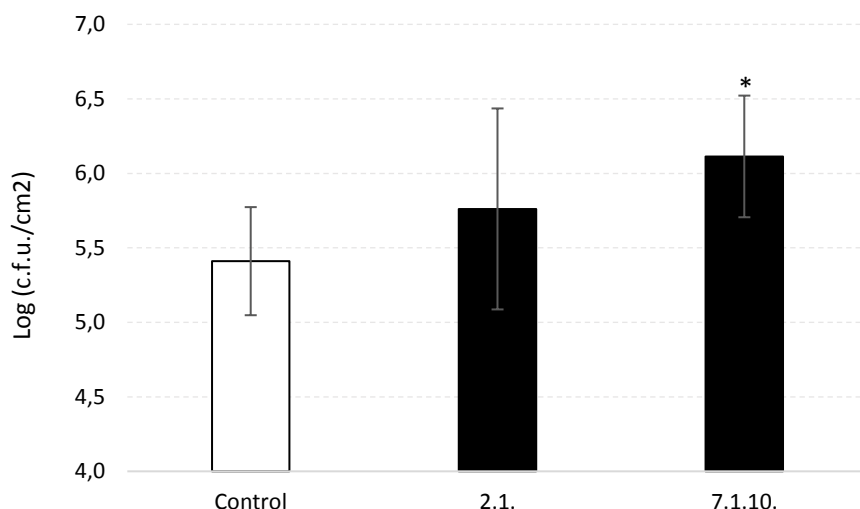


Figura 12. Crecimiento de la bacteria Pto DC3000 AvrPto en hojas de planta de tomate RG controles y transgénicas, con el gen *MTS1* silenciado. Los resultados, obtenidos 24 horas después de la infección, se expresan como el logaritmo de las c.f.u. por cm² de hoja. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) es indicativo de que existe una significación estadística entre las plantas control y las transgénicas, con un p -value $< 0,05$.

4.5. PERSPECTIVAS FUTURAS

En este Trabajo Final de Grado se ha estudiado el papel defensivo del gen *MTS1* de la variedad de tomate Rio Grande frente a la infección con la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Este gen es responsable de la biosíntesis de dos monoterpenos, linalool y α -terpineol (Minguillón Campos, 2018), implicados en la respuesta defensiva inducida en este tipo de interacción (López-Gresa *et al.*, 2017), posiblemente a nivel de regulación de las rutas de señalización (Kabbas Piñango, 2015).

Los resultados presentados en el presente trabajo proporcionan nuevos datos acerca de la participación de los mencionados monoterpenos en la defensa frente a la bacteria, así como en la regulación del comportamiento estomático. El papel desempeñado por los monoterpenos en la comunicación entre plantas ha sido estudiado previamente en nuestro laboratorio, observándose que la sobreexpresión de *MTS1* da lugar al cierre estomático en plantas vecinas (Minguillón Campos, 2018). Sería interesante el estudio de la sobreexpresión o el silenciamiento de genes implicados en la biosíntesis de otros monoterpenos, como el gen *AZII* (*Azelaic Acid Induced1*), implicado en la inducción de resistencia bacteriana mediante pinenos (Riedlmeier *et al.*, 2017).

Además, se ha descrito que la aplicación exógena de monoterpenos también es capaz de inducir la resistencia frente a infección bacteriana en diversas especies, como el frijol (Arimura *et al.*, 2000) o *Arabidopsis thaliana* (Riedlmeier *et al.*, 2017), por lo que estos resultados podrían emplearse para el desarrollo de nuevos productos capaces de potenciar la respuesta defensiva en las plantas, tanto basados únicamente en la encapsulación de monoterpenos como combinados con otros VOCs implicados en la respuesta defensiva y capaces de inducir el cierre estomático (Payá Montes, 2017). La posibilidad de encapsular monoterpenos ha sido demostrada recientemente, siendo además efectiva en el caso del linalool y el α -terpineol, ambos estudiados en el presente trabajo, y permitiría reducir el empleo de pesticidas químicos (Lucia *et al.*, 2017).

En referencia a la señalización defensiva, las principales fitohormonas implicadas en la respuesta frente a la infección y en el comportamiento estomático son SA, ABA y JA, cuyos niveles de expresión han sido evaluados en este trabajo mediante distintos genes marcadores. No obstante,

hormonas como el ET, auxinas o citoquininas también están implicadas, y sería interesante profundizar en sus vías de señalización, ya sea mediante el seguimiento de genes marcadores, al igual que se ha realizado en el presente trabajo, o mediante la obtención de plantas transgénicas o mutantes incapaces de sintetizar estas fitohormonas o de regular el comportamiento estomático bajo condiciones de estrés (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013).

Como conclusión, una vez conocida la importancia de los monoterpenos en la respuesta defensiva de las plantas, una posible herramienta biotecnológica basada en estos resultados consistiría en obtener plantas transgénicas capaces de sobreexpresar *MTS1*, pues la emisión constitutiva de VOCs implicados en la respuesta defensiva permitiría reducir la susceptibilidad de la propia planta y de plantas vecinas frente al ataque de patógenos. De hecho, al tratarse de compuestos volátiles, la presencia de un reducido número de plantas sobreproductoras de VOCs podría proteger amplias extensiones de cultivo. De esta forma, a pesar de que no se considera que la peca bacteriana del tomate tenga un gran impacto económico, sí se conoce que afecta al rendimiento y la calidad del fruto (Bashan y de-Bashan, 2002), por lo que la obtención de plantas transgénicas capaces de inducir resistencia frente a la bacteria permitiría reducir el empleo de tratamientos químicos en la protección de cultivos.

CONCLUSIONES⁵

- I. Las plantas transgénicas de tomate de la variedad Rio Grande que tienen silenciado el gen *MTSI* presentan una capacidad reducida de cierre estomático.
- II. La mayor apertura estomática de las líneas de silenciamiento de *MTSI* correlaciona con una mayor susceptibilidad a la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.
- III. La menor capacidad de cierre estomático viene correlacionada con una inducción de la señalización por SA en las mencionadas plantas, mientras que los marcadores asociados a la señalización mediada por ABA y JA sufren un descenso en su expresión.
- IV. Las rutas de señalización patogénica mediadas por ácido salicílico, ácido abscísico y ácido jasmónico están también implicadas en el cierre estomático y se encuentran alteradas en las plantas transgénicas que silencian *MTSI*. Los efectos de dicha alteración encontrados en este trabajo son consistentes con el antagonismo descrito entre la señalización patogénica regulada por SA y la regulada por ABA y JA.

BIBLIOGRAFÍA ⁶

ABRAMOVITCH, R.B.; MARTIN, G.B., 2004. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4): 356-364.

AGRIOS, G.N., 1995. *Fitopatología*. Editorial Limusa S.A. De C.V. México. 838 pp.

ALMAGRO, L.; GÓMEZ ROS, L.V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELÓ, A.; PEDREÑO, M.A., 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60(2): 377-390.

ALONSO-RAMÍREZ, A.; RODRÍGUEZ, D.; REYES, D.; JIMÉNEZ, J.A.; NICOLÁS, G.; LÓPEZ-CLIMENT, M.; GÓMEZ-CADENAS, A.; NICOLÁS, C., 2009. Cross-talk between gibberellins and salicylic acid in early stress responses in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8): 750-751.

ANDERSON, J.P.; BADRUZSAUFARI, E.; SCHENK, P.M.; MANNERS, J.M.; DESMOND, O.J.; EHLERT, C.; MACLEAN, D.J.; EBERT, P.R.; KAZAN, K., 2004. Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(12): 3460.

ARIE, T.; TAKAHASHI, H.; KODAMA, M.; TERAOKA, T., 2007. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*, 24(1): 135-147.

ARIMURA, G.-I.; OZAWA, R.; SHIMODA, T.; NISHIOKA, T.; BOLAND, W.; TAKABAYASHI, J., 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*, 406: 512.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E., 2002. Reduction of Bacterial Speck (*Pseudomonas syringae* pv. tomato) of Tomato by Combined Treatments of Plant Growth-promoting Bacterium, *Azospirillum brasilense*, Streptomycin Sulfate, and Chemo-thermal Seed Treatment. *European Journal of Plant Pathology*, 108(9): 821-829.

BELLÉS, J.M.; GARRO, R.; FAYOS, J.; NAVARRO, P.; PRIMO, J.; CONEJERO, V., 1999. Gentisic Acid As a Pathogen-Inducible Signal, Additional to Salicylic Acid for Activation of Plant Defenses in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(3): 227-235.

BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H., 2015. Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4): 521-539.

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(1): 379-406.

BUELL, C.R.; JOARDAR, V.; LINDEBERG, M.; SELENGUT, J.; PAULSEN, I.T.; GWINN, M.L.; DODSON, R.J.; DEBOY, R.T.; DURKIN, A.S.; KOLONAY, J.F.; MADUPU, R.; DAUGHERTY, S.; BRINKAC, L.; BEANAN, M.J.; HAFT, D.H.; NELSON, W.C.; DAVIDSEN, T.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; LIU, J.; YUAN, Q.; KHOURI, H.; FEDOROVA, N.; TRAN, B.; RUSSELL, D.; BERRY, K.; UTTERBACK, T.; VAN AKEN, S.E.; FELDBLYUM, T.V.; D'ASCENZO, M.; DENG, W.-L.; RAMOS, A.R.; ALFANO, J.R.; CARTINHO, S.; CHATTERJEE, A.K.; DELANEY, T.P.; LAZAROWITZ, S.G.; MARTIN, G.B.; SCHNEIDER, D.J.; TANG, X.; BENDER, C.L.; WHITE, O.; FRASER, C.M.; COLLMER, A., 2003. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18): 10181-10186.

CAO, J.; LI, X., 2015. Identification and phylogenetic analysis of late embryogenesis abundant proteins family in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta*, 241(3): 757-772.

CAO, Y.; HU, S.; DAI, Q.; LIU, Y., 2014. Tomato terpene synthases TPS5 and TPS39 account for a monoterpene linalool production in tomato fruits. *Biotechnology Letters*, 36(8): 1717-1725.

CLARKE, J.D.; VOLKO, S.M.; LEDFORD, H.; AUSUBEL, F.M.; DONG, X., 2000. Roles of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, and Ethylene in cpr-Induced Resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12(11): 2175-2190.

CLAVIJO MCCORMICK, A.; UNSICKER, S.B.; GERSHENZON, J., 2012. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends in Plant Science*, 17(5): 303-310.

CONNOLLY, J.D.; HILL, R.A., 1991. *Dictionary of Terpenoids*. Taylor & Francis. 2156.

COPOLOVICI, L.O.; FILELLA, I.; LLUSIÀ, J.; ÜLO, N.; PEÑUELAS, J., 2005. The Capacity for Thermal Protection of Photosynthetic Electron Transport Varies for Different Monoterpenes in *Quercus ilex* L. *Plant Physiology*, 139(1): 485-496.

CHANGBAO, L.; JIAQIANG, S.; HONGLING, J.; XIAOYAN, W.; CHUANYOU, L., 2005. Systemic defense signaling in tomato. *Chinese Science Bulletin*, 50(17): 1817-1822.

CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E., 2011. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal*, 66(1): 212-229.

CHISHOLM, S.T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B.J., 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, 124(4): 803-814.

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: 138.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T.G.; GERSHENZON, J., 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70(15): 1621-1637.

DIXON, R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411: 843.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN JOËLLE, K.; KAPLAN, I., 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1): 16-32.

DURE, L.; GREENWAY, S.C.; GALAU, G.A., 1981. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*, 20(14): 4162-4168.

EKENGREN SOPHIA, K.; LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S.P.; MARTIN GREGORY, B., 2003. Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *The Plant Journal*, 36(6): 905-917.

FALARA, V.; AKHTAR, T.A.; NGUYEN, T.T.H.; SPYROPOULOU, E.A.; BLEEKER, P.M.; SCHAUVINHOLD, I.; MATSUBA, Y.; BONINI, M.E.; SCHILMILLER, A.L.; LAST, R.L.; SCHUURINK, R.C.; PICHERSKY, E., 2011. The Tomato Terpene Synthase Gene Family. *Plant Physiology*, 157(2): 770-789.

FAN, J.; HILL, L.; CROOKS, C.; DOERNER, P.; LAMB, C., 2009. Abscisic Acid Has a Key Role in Modulating Diverse Plant-Pathogen Interactions. *Plant Physiology*, 150(4): 1750-1761.

FLOR, H.H., 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1): 275-296.

GLAZEBROOK, J., 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1): 205-227.

GONZÁLEZ-GUZMÁN, M.; RODRÍGUEZ, L.; LORENZO-ORTS, L.; PONS, C.; SARRIÓN-PERDIGONES, A.; FERNÁNDEZ, M.A.; PEIRATS-LLOBET, M.; FORMENT, J.; MORENO-ALVERO, M.; CUTLER, S.R.; ALBERT, A.; GRANELL, A.; RODRÍGUEZ, P.L., 2014. Tomato PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors show high expression in root, differential sensitivity to the abscisic acid agonist quinabactin, and the capability to enhance plant drought resistance. *Journal of Experimental Botany*, 65(15): 4451-4464.

GOYAL, K.; WALTON, LAURA J.; TUNNAcliffe, A., 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal*, 388(Pt 1): 151-157.

GREEFF, C.; ROUX, M.; MUNDY, J.; PETERSEN, M., 2012. Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Frontiers in Plant Science*, 3(209).

HIRANO, S.S.; UPPER, C.D., 2000. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3): 624-653.

ISHIGA, Y.; ISHIGA, T.; UPPALAPATI, S.R.; MYSORE, K.S., 2013. Jasmonate ZIM-Domain (JAZ) Protein Regulates Host and Nonhost Pathogen-Induced Cell Death in Tomato and *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 8(9): e75728.

JONES, J.D.G.; DANGL, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323.

KABBAS PIÑANGO, E., 2015. *Estudio del papel de compuestos volátiles de tomate en la defensa frente a una infección bacteriana*. Trabajo Final de Grado. Universitat Politècnica de València. 94 pp.

KUSAJIMA, M.; OKUMURA, Y.; FUJITA, M.; NAKASHITA, H., 2017. Abscisic acid modulates salicylic acid biosynthesis for systemic acquired resistance in tomato. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(9): 1850-1853.

LING, H.; ZENG, X.; GUO, S., 2016. Functional insights into the late embryogenesis abundant (LEA) protein family from *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) using an *Escherichia coli* system. *Scientific Reports*, 6: 39693.

LISÓN, P.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V., 2006. A Novel Function for the Cathepsin D Inhibitor in Tomato. *Plant Physiology*, 142(3): 1329-1339.

LIU, Y.; WANG, L.; XING, X.; SUN, L.; PAN, J.; KONG, X.; ZHANG, M.; LI, D., 2013. ZmLEA3, a Multifunctional Group 3 LEA Protein from Maize (*Zea mays* L.), is Involved in Biotic and Abiotic Stresses. *Plant and Cell Physiology*, 54(6): 944-959.

LÓPEZ-GRESA, M.P.; LISÓN, P.; CAMPOS, L.; RODRIGO, I.; RAMBLA, J.L.; GRANELL, A.; CONEJERO, V.; BELLÉS, J.M., 2017. A Non-targeted Metabolomics Approach Unravels the VOCs Associated with the Tomato Immune Response against *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Plant Science*, 8(1188).

LÓPEZ-GRESA, M.P.; MALTESE, F.; BELLÉS JOSÉ, M.; CONEJERO, V.; KIM HYE, K.; CHOI YOUNG, H.; VERPOORTE, R., 2009. Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochemical Analysis*, 21(1): 89-94.

LÓPEZ-GRESA, M.P.; TORRES, C.; CAMPOS, L.; LISÓN, P.; RODRIGO, I.; BELLÉS, J.M.; CONEJERO, V., 2011. Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environmental and Experimental Botany*, 74: 216-228.

LUCIA, A.; TOLOZA, A.C.; GUZMÁN, E.; ORTEGA, F.; RUBIO, R.G., 2017. Novel polymeric micelles for insect pest control: encapsulation of essential oil monoterpenes inside a triblock copolymer shell for head lice control. *PeerJ*, 5: e3171.

MEHTA, A.; BRASILEIRO, A.C.M.; SOUZA, D.S.L.; ROMANO, E.; CAMPOS, M.A.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; SILVA, M.S.; FRANCO, O.L.; FRAGOSO, R.R.; BEVITORI, R.; ROCHA, T.L., 2008. Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us? *The FEBS Journal*, 275(15): 3731-3746.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; HE, S.Y., 2008. Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual review of phytopathology*, 46: 101-122.

MINGUILLÓN CAMPOS, S., 2018. *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. Universitat Politècnica de València. 66 pp.

MUHLEMANN JOËLLE, K.; KLEMPIEN, A.; DUDAREVA, N., 2014. Floral volatiles: from biosynthesis to function. *Plant, Cell & Environment*, 37(8): 1936-1949.

NEWMAN, M.-A.; SUNDELIN, T.; NIELSEN, J.; ERBS, G., 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4(139).

NIINEMETS, Ü.; REICHSTEIN, M.; STAUDT, M.; SEUFERT, G.; TENHUNEN, J.D., 2002. Stomatal Constraints May Affect Emission of Oxygenated Monoterpenoids from the Foliage of Pinus pinea. *Plant Physiology*, 130(3): 1371.

NOGUÉS, I.; MUZZINI, V.; LORETO, F.; BUSTAMANTE, M.A., 2015. Drought and soil amendment effects on monoterpene emission in rosemary plants. *Science of The Total Environment*, 538: 768-778.

OZÁEZ MARTÍNEZ, M., 2017. *Papel defensivo de los compuestos volátiles de hoja verde en plantas de tomate frente a una infección bacteriana*. Trabajo Final de Máster. Universitat Politècnica de València.

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 Final de Grado. Universitat Politècnica de València. 57 pp.

PEDLEY, K.F.; MARTIN, G.B., 2003. MOLECULAR BASIS OF PTO-MEDIATED RESISTANCE TO BACTERIAL SPECK DISEASE IN TOMATO. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1): 215-243.

PICHERSKY, E.; NOEL, J.P.; DUDAREVA, N., 2006. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Science*, 311(5762): 808.

RIEDLMEIER, M.; GHIRARDO, A.; WENIG, M.; KNAPPE, C.; KOCH, K.; GEORGII, E.; DEY, S.; PARKER, J.E.; SCHNITZLER, J.-P.; VLOT, A.C., 2017. Monoterpenes Support Systemic Acquired Resistance within and between Plants. *The Plant Cell*, 29(6): 1440.

ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M.; JONES, J.D.G., 2011. Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1): 317-343.

SANTAMARIA, M.E.; MARTÍNEZ, M.; CAMBRA, I.; GRBIC, V.; DIAZ, I., 2013. Understanding plant defence responses against herbivore attacks: an essential first step towards the development of sustainable resistance against pests. *Transgenic Research*, 22(4): 697-708.

SCALSCHI, L.; VICEDO, B.; CAMAÑES, G.; FERNANDEZ-CRESPO, E.; LAPEÑA, L.; GONZÁLEZ-BOSCH, C.; GARCÍA-AGUSTÍN, P., 2012. 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(4): 342-355.

SEGONZAC, C.; ZIPFEL, C., 2011. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1): 54-61.

SINGH, B.; SHARMA, R.A., 2015. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*, 5(2): 129-151.

SONG, Y.Y.; ZENG, R.S.; XU, J.F.; LI, J.; SHEN, X.; YIHDEGO, W.G., 2010. Interplant Communication of Tomato Plants through Underground Common Mycorrhizal Networks. *PLoS ONE*, 5(10): e13324.

SPOEL, S.H.; DONG, X., 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12: 89.

SRIPINYOWANICH, S.; KLOMSAKUL, P.; BOONBURAPONG, B.; BANGYEEKHUN, T.; ASAMI, T.; GU, H.; BUABOOCHA, T.; CHADCHAWAN, S., 2013. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of OsP5CS1 and OsP5CR gene expression during salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 86: 94-105.

STAUDT, M.; BERTIN, N., 2002. Light and temperature dependence of the emission of cyclic and acyclic monoterpenes from holm oak (*Quercus ilex* L.) leaves. *Plant, Cell & Environment*, 21(4): 385-395.

SUN, Z.-M.; ZHOU, M.-L.; XIAO, X.-G.; TANG, Y.-X.; WU, Y.-M., 2014. Genome-wide analysis of AP2/ERF family genes from *Lotus corniculatus* shows LcERF054 enhances salt tolerance. *Functional & Integrative Genomics*, 14(3): 453-466.

TANG, X.; FREDERICK, R.D.; ZHOU, J.; HALTERMAN, D.A.; JIA, Y.; MARTIN, G.B., 1996. Initiation of Plant Disease Resistance by Physical Interaction of AvrPto and Pto Kinase. *Science*, 274(5295): 2060.

- TANIGUCHI, S.; HOSOKAWA-SHINONAGA, Y.; TAMAOKI, D.; YAMADA, S.; AKIMITSU, K.; GOMI, K., 2013. Jasmonate induction of the monoterpene linalool confers resistance to rice bacterial blight and its biosynthesis is regulated by JAZ protein in rice. *Plant, Cell & Environment*, 37(2): 451-461.
- TIAN, D.; TOOKER, J.; PEIFFER, M.; CHUNG, S.H.; FELTON, G.W., 2012. Role of trichomes in defense against herbivores: comparison of herbivore response to woolly and hairless trichome mutants in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta*, 236(4): 1053-1066.
- TOLLETER, D.; HINCHA, D.K.; MACHEREL, D., 2010. A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1798(10): 1926-1933.
- TON, J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B., 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14(6): 310-317.
- VAN LOON, L.C., 1985. Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 4(2): 111-116.
- VAN SCHIE, C.C.N.; HARING, M.A.; SCHUURINK, R.C., 2007. Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Molecular Biology*, 64(3): 251-263.
- VERA, P.; HERNÁNDEZ-YAGO, J.; CONEJERO, V., 1989. 'Pathogenesis-related' *PI(p14)* Protein. Vacuolar and Apoplastic Localization in Leaf Tissue from Tomato Plants Infected with *Citrus Exocortis Viroid*; *in vitro* Synthesis and Processing. *Journal of General Virology*. Great Britain. 1933-1942.
- VIVIAN, A.; GIBBON, M.J., 1997. Avirulence genes in plant-pathogenic bacteria: signals or weapons? *Microbiology*, 143(3): 693-704.
- VRANOVA, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W., 2013. Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1): 665-700.
- WHALEN, M.C.; INNES, R.W.; BENT, A.F.; STASKAWICZ, B.J., 1991. Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Cell*, 3(1): 49-59.
- WIESEL, L.; NEWTON, A.C.; ELLIOTT, I.; BOOTY, D.; GILROY, E.M.; BIRCH, P.R.J.; HEIN, I., 2014. Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 5(655).
- XIN, X.-F.; HE, S.Y., 2013. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1): 473-498.

YANG, X.; DENG, F.; RAMONELL, K.M., 2012. Receptor-like kinases and receptor-like proteins: keys to pathogen recognition and defense signaling in plant innate immunity. *Frontiers in Biology*, 7(2): 155-166.

YING, C.Y.; HUANG, X.Q.; GUO, Y.Q.; ZHONG, L.L.; LIU, Y.; LI, S.L.; GU, X.M.; ZHOU, X.H., 2008. Optimization of tomato genetic transformation, kanamycin-resistant screening and seed selection. *Journal of Southern Medical University*, 28(7): 1117-1122.

ZHANG, Y.; LUBBERSTEDT, T.; XU, M., 2013. The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(1): 23-35.

ZHAO, Y.; THILMONY, R.; BENDER CAROL, L.; SCHALLER, A.; HE SHENG, Y.; HOWE GREGG, A., 2003. Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *The Plant Journal*, 36(4): 485-499.

ZVEREVA, A.S.; POOGGIN, M.M., 2012. Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. *Viruses*, 4(11): 2578-2597.