

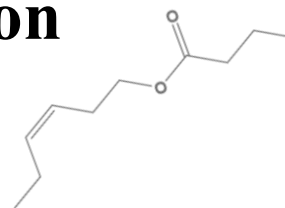


UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



**MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE
PLANTAS**

Butanoato de (Z)-3-hexenilo: eficacia y mecanismo de acción



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: **2017/2018**

Realizado por:

Celia Payá Montes

Directoras:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Dra. M^a Pilar López Gresa

Valencia, Enero 2019

Resumen

Valencia, Enero 2019

Butanoato de (Z)-3-hexenilo: eficacia y mecanismo de acción.

En respuesta a señales de estrés, las plantas sintetizan proteínas de defensa y compuestos químicos de diversa naturaleza. Entre otros, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) pertenecen a este grupo de compuestos defensivos (Niinemets *et al.*, 2013).

A través de un análisis metabolómico no dirigido empleando la técnica de GC-MS, se identificaron algunos ésteres de (Z)-3-hexenilo que se inducían de manera diferencial como consecuencia de la infección de plantas de tomate “Rio Grande” con la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (López-Gresa *et al.*, 2017). Para confirmar el papel defensivo de estos ésteres, se evaluaron tanto sus propiedades defensivas directas (antibacterianas y/o antioxidantes), como su papel defensivo indirecto mediante tratamientos exógenos en plantas de tomate, y se analizaron diferentes aspectos como la resistencia o susceptibilidad a la infección bacteriana, la acumulación de compuestos señalizadores, la inducción de proteínas de defensa o el efecto sobre el cierre estomático. De entre estos ésteres, cabe destacar el butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB), que tras ser aplicado directamente sobre las plantas de tomate, no sólo produjo la inducción de proteínas y metabolitos defensivos, sino que también produjo un claro cierre de los estomas, provocando así un aumento de la resistencia frente a la infección bacteriana. Dicho compuesto ha sido patentado por estas características (Lisón *et al.*, 2017).

En este proyecto se profundiza en el estudio del mecanismo de acción del HB y se comprueba su eficacia en otras especies vegetales de interés agronómico y frente a estreses de tipo abiótico en los que la regulación del cierre estomático sea esencial, como la sequía. Nuestros estudios refuerzan la importancia de los VOCs como compuestos fundamentales en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos, además de ofrecer un nuevo producto, el HB, que puede tener un gran uso en agricultura.

Palabras clave: VOCs, ésteres de (Z)-3-hexenilo, tomate, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

Autora:

Celia Payá Montes

Directoras:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Dra. M^a Pilar López Gresa

Abstract

Valencia, January 2019

(Z)-3-hexenyl butyrate: efficacy and mode of action.

In response to stress signals, plants synthesize defense proteins and several chemical compounds. Among others, volatile organic compounds (VOCs) belong to this defensive compounds group (Niinemets *et al.*, 2013).

A non-targeted GC-MS metabolomic analysis showed that some esters of (Z)-3-hexenol were differentially emitted by tomato cv. Rio Grande plants upon infection with the avirulent strain of the bacterium *Pseudomonas syringae* DC3000 pv. *tomato* (*Pst*) (Lopez-Gresa *et al.*, 2017). To confirm the defensive role of these esters, both direct defensive properties (antibacterial and/or antioxidant), and their indirect defensive role, through exogenous treatments of tomato plants, were evaluated. Different aspects such as resistance or susceptibility to bacterial infection, signaling compounds accumulation, defense proteins induction or stomatal closure were also studied. Among all these esters of (Z)-3-hexenol, treatments of plants with (Z)-3-hexenyl butyrate (HB), resulted in stomatal closure, *PR* gene induction and enhanced resistance to the bacteria. Recently, this compound has been patented (Lisón *et al.*, 2017).

This project has focused on the mode of action of HB and its efficacy in other plant species and against different abiotic stresses in which stomatal regulation has a pivotal effect, such as drought. Our results reinforce the importance of VOCs as fundamental compounds in the defensive response of plants against pathogens, besides offering a new product, the HB, that can have a great use and value in agriculture.

Keywords: VOCs, (Z)-3-hexenyl esters, tomato, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

Author:

Celia Payá Montes

Directors:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Dra. M^a Pilar López Gresa

Agradecimientos

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad"(Albert Einstein).

Me gustaría empezar con esta cita ya que refleja a la perfección lo que he aprendido y vivido en mis dos últimos años de formación, y todo gracias a Puri y Mapi. De nuevo os doy gracias por toda la confianza que habéis depositado en mí, por creer más en mí que incluso yo en algunas ocasiones. Sigo pensando que vosotras si que sois unas cracks.

También me gustaría expresar mi más sincera gratitud a todas y cada una de las personas que me han ayudado en este proyecto.

A Isamel y Jose M^a, por toda vuestra sabiduría y consejos. Ha sido un placer formar parte de vuestro equipo.

A todos los "pupilos" que formamos parte de este gran equipo, Patrick, Fran y Silvia, y por supuesto a Kiko y Samuel, que aunque ya no estéis habéis dejado una huella muy importante. Como no, a Edu y Samuel, por aguantarme cada día, con mejor o peor humor. Gracias por poder contar con vosotros siempre que lo necesite y amenizarme esos días que parece que no acaban nunca.

Al becario más friki. Por los buenos momentos, que superan con creces a los malos, y todos los planes y vermouths que nos esperan. Gracias por saber aguantarme, a veces.

A Miguel, Maikel, mi mentor y sobre todo un gran amigo, del que he aprendido que hay que tener en cuenta hasta el mínimo detalle para que todo salga perfecto. Gracias no solo profesionalmente, sino también por tu amistad.

Por último, y no menos importante, gracias gracias y gracias a mi mis padres y mi hermana, el pilar de apoyo más importante, sólido, y que va a estar ahí siempre. Gracias a vosotros me he convertido en la persona que soy.

Ha sido un placer trabajar y compartir este proyecto con vosotros.

Índice general

Resumen	I
Abstract	III
Índice general	VI
Índice de figuras	VIII
1. Introducción	1
1.1. Respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos	1
1.1.1. Percepción del patógeno y señalización de la respuesta defensiva	1
1.1.2. La respuesta defensiva frente a la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	3
1.2. Regulación estomática en la respuesta defensiva de las plantas	4
1.2.1. Defensa estomática frente a patógenos	5
1.3. El papel de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en el sistema defensivo de las plantas	6
1.3.1. Green Leaf Volatiles (GLVs)	7
1.3.2. VOCs en la interacción planta-patógeno	8
2. Objetivos	11
3. Materiales y Métodos	13
3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	13
3.1.1. Germinación de semillas	13
3.1.2. Condiciones normales de cultivo	13
3.2. Tratamiento con butanoato de (Z)-3-hexenilo	13
3.2.1. Tratamientos en cámaras de metacrilato	13
3.2.2. Tratamientos por pulverización en diferentes especies vegetales	13
3.3. Material microbiológico, infección y conteo bacteriano	14
3.3.1. Preparación del inóculo bacteriano	14
3.3.2. Infección bacteriana	14
3.3.3. Conteo bacteriano en hojas de tomate	14
3.4. Medidas de apertura estomática	15
3.5. Medidas de conductividad por fuga de electrolitos	15
3.6. Toma de muestra	15
3.7. Análisis cuantitativo de transcritos mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR)	16
3.7.1. Extracción y cuantificación del RNA total	16
3.7.2. Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)	16
3.8. Análisis transcriptómico mediante secuenciación de RNA (RNA-Seq)	17
3.9. Análisis de compuestos volátiles mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	17
3.10. Análisis estadístico y bioinformático	17

4. Resultados y Discusión	19
4.1. Antecedentes	19
4.2. Mecanismo de acción del butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB)	20
4.2.1. Modo de acción del HB como inductor de resistencia frente a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	20
4.2.2. Estudio de la señalización de la respuesta defensiva inducida por HB	21
4.2.3. Estudio del cierre estomático y acumulación de HB asociado al establecimiento de ETI	22
4.2.4. Análisis de los cambios transcriptómicos producidos por HB en hojas de tomate	24
4.3. Posibles aplicaciones del butanoato de Z-3-hexenilo en agricultura	27
4.3.1. Papel de butanoato de (Z)-3-hexenilo frente a estrés hídrico	27
4.3.2. Estudio de la duración del efecto y la eficacia de HB en diferentes especies vegetales	30
4.4. Perspectivas futuras	33
5. Conclusiones	35
6. Bibliografía	37

Anexo

Índice de figuras

1.1. Modelo en zig-zag ilustrativo del sistema defensivo de las plantas. En la fase I, la planta reconoce los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de los PRRs (<i>Pattern Recognition Receptors</i>), desencadenando la inmunidad activada por estas moléculas (<i>PAMPs-Triggered Inminuty</i> , PTI). En la fase II, algunos patógenos producen efectores que pueden interferir con la PTI ocasionando la susceptibilidad desencadenada por el efector (<i>Effector-Triggered Susceptibility</i> , ETS). En la fase III, el factor de avirulencia <i>Avr</i> es reconocido por una proteína <i>R</i> y se activa la inmunidad ligada al efector (<i>Effector-Triggered Immunity</i> , ETI) que suele desencadenar una respuesta hipersensible (HR), produciéndose la muerte celular en el lugar de la infección (Adaptación de Jones y Dangl, 2006).	3
1.2. Diagrama del ciclo infectivo de <i>Pseudomonas syringae</i>. (a) Hojas sanas. (b) Bacterias en la superficie foliar. (c) Bacterias penetrando por un estoma abierto. (d) Colonización de las bacterias en el apoplasto. (e) Multiplicación bacteriana. (f) Aparición de síntomas, tales como necrosis y clorosis (Melotto <i>et al.</i> , 2008)	4
1.3. Señalización de la regulación estomática tras la infección con <i>Pseudomonas syringae</i>. Una vez la bacteria penetra en la planta a través de los estomas, diferentes elicitors bacterianos (PAMPs) activan la respuesta defensiva PTI que induce el cierre de estomas mediado por las vías señalización hormonal del SA y el ABA. Para contrarrestar este fenómeno, la bacteria <i>Pst</i> produce la fitotoxina coronatina que activa la señalización del JA. La activación de la señalización regulada por JA inhibe la acción del SA y el ABA, produciéndose la reapertura estomática (Adaptación de Xin <i>et al.</i> , 2018).	6
1.4. Ruta de biosíntesis de GLVs. Una vez los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs; ácido linoleico y linoleico), precursores de la síntesis de VOCs, entran en la ruta de las lipoxigenasas (LOXs), actúan una serie de enzimas como la hidroperóxido liasa (HPL), alcohol deshidrogenasa (ADH) y alcohol aciltransferasa (AAT) para dar lugar a la formación de GLVs (Adaptación de ul Hassan <i>et al.</i> , 2015).	8
3.1. Representación de la medida del ancho (D) y el alto (d) de un estoma tipo. . . .	15
3.2. Representación de una hoja compuesta de tomate. A cada foliolo de la 3ª y 4ª hoja le corresponde una letra, siendo (a) el foliolo del extremo, (b) y (c) los foliolos intermedios y (d) y (e) aquellos que se encuentran más próximos al tallo .	16
4.1. Crecimiento de <i>Pst</i> en hojas de plantas de tomate Flora-Dade, tratadas o no con HB tras inoculación bacteriana mediante inmersión (A) e inyección (B). El recuento de unidades formadoras de colonias (CFU) se realizó 24 h después de la inoculación bacteriana. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de 6 plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un <i>t-test</i> con los datos de cada uno de los tres experimentos independientes. El triple asterisco (***) indica que existen diferencias significativas con un <i>p-value</i> <0.001.	20

-
- 4.2. **Efecto del tratamiento con butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) en plantas de tomate MoneyMaker y NahG.** (A) Ratio de apertura estomática de plantas tratadas (HB) o no (CONTROL) con HB. (B) Crecimiento de *Pst* en hojas de tomate tratadas o no con HB. Las muestras fueron tomadas 24 h después de los tratamientos para analizar la apertura estomática. El crecimiento de *Pst* fue evaluado 24 h después de la infección. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de 5 plantas independientes de un experimento representativo. El triple asterisco (***) indica que existe una diferencia significativa de las plantas pre-tratadas con HB respecto a las plantas control, con un *p-value* <0.001. 22
- 4.3. **Estudio del cierre estomático (A) y emisión de butanoato de (Z)-3-hexenilo (B) en hojas de tomate Rio Grande tras infección con *Pst* (Pst) y *Pst* con deleciones en los genes *AvrPto* y *AvrPtoB* (Δ Pst).** Las muestras fueron tomadas a 1 h y 4 h tras la inoculación. Las barras representan la media \pm el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) y doble asterisco (**) indica que existe una diferencia significativa de las plantas infectadas con *Pst* y aquellas infectadas con Δ Pst con un *p-value* <0.05 y *p-value* <0.01, respectivamente. 23
- 4.4. **Modelo en zig-zag para la defensa estomática.** De manera análoga al modelo en zig-zag previamente propuesto para el sistema defensivo de las plantas (Jones y Dangl, 2006) se pueden definir tres fases dentro en la defensa estomática. En la fase I, se produce el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y las plantas responden cerrando sus estomas a través de la respuesta defensiva mediada por ABA y SA, contribuyendo a la PTI. En la fase II, la coronatina bacteriana provoca la reapertura de los estomas dependiente de la señalización por JA e interfiriendo con la PTI. En la fase III, los efectores bacterianos son reconocidos por la planta, activando la inmunidad asociada a efectores (ETI) y la planta actúa volviendo a cerrar los estomas a través de un proceso dependiente de GLVs e independiente de SA. 24
- 4.5. **Efecto del butanoato de (Z)-3-hexenilo en plantas de tomate Flora-Dade sometidas a estrés hídrico.** (A) Ratio de apertura estomática, (B) peso y (C) fuga de electrolitos de plantas de tomate tratadas (HB) o no (CONTROL) y sometidas (Sequía) o no (H_2O) a estrés hídrico. Se llevó a cabo el análisis de todos los parámetros tras 3 y 6 días después de establecer las condiciones de estrés. Las barras representan la media \pm el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizó un test ANOVA, las letras diferentes indican diferencias significativas con un *p-value* <0.05 entre las diferentes muestras. . . . 28
-

4.6.	<p>Expresión de los genes <i>RAB18</i>, <i>P5CS1</i> y <i>LEA</i> en plantas de tomate Flora-Dada tratadas (HB) o no (CONTROL) con butanoato de (Z)-3-hexenilo, sometidas (Sequía) o no (H_2O) a estrés hídrico. (A) Niveles de expresión de <i>RAB18</i>, (B) <i>P5CS1</i> y (C) <i>LEA</i> en hojas de tomate tras ser sometidas a un periodo de sequía de 6 días. Los tratamientos con HB se realizaron cada dos días. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen <i>actina</i>. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizó un test ANOVA y las letras diferentes indican diferencias significativas con un <i>p-value</i> <0.05 entre las diferentes muestras. .</p>	29
4.7.	<p>Duración del efecto de HB en plantas de tomate. Se midió el ratio de apertura estomática en plantas control (CONTROL) y tratadas con HB (HB) a 0 (T0), 6, 10, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento (h) y a 7 y 10 días (d) después de los tratamientos. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los ratios corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 50 estomas correspondientes a 3 plantas independientes de un experimento representativo. El doble (**) y triple asterisco (***) indican que existe una significación estadística con un <i>p-value</i> <0.01 y un <i>p-value</i> <0.001 entre las plantas control y las plantas tratadas.</p>	30
4.8.	<p>Efecto de HB en diferentes especies vegetales. El ratio de apertura estomática fue analizado en las diferentes especies a a 0 (T0), 24 y 48 horas post-tratamiento. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los ratios corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 50 estomas correspondientes a 3 plantas independientes de un experimento representativo. El simple (*) doble (**) y triple asterisco (***) indican que existe una significación estadística con un <i>p-value</i> <0.01, <i>p-value</i> <0.01 y <i>p-value</i> <0.001, respectivamente.</p>	31

Lista de abreviaturas

AAT : Alcohol Aciltransferasa

ABA : Ácido Abscísico

ADH : Alcohol Deshidrogenasa

Avr : Factor de avirulencia

CFU : Unidades formadoras de colonias

COR : Coronatina

DAMPs : *Damage-Associated Molecular Patterns*

eEF1 α : Factor de Elongación 1 alfa

EF-Tu : Factor de elongacion bacteriano Tu

ET : Etileno

ETI : *Effector-Triggered Immunity*

ETS : *Effector-Triggered Susceptibility*

FD : Flora-Dade

FLS2 : *Flagellin-sensitive 2*

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

GLVs : *Green Leaf Volatiles*

HA : Acetato de (Z)-3-hexenilo

HB : Butanoato de (Z)-3-hexenilo

HiB : Isobutanoato de (Z)-3-hexenilo

HP : Propanoato de (Z)-3-hexenilo

HPL : Hidroperóxido Liasa

HR : *Hypersensitive Reaction*

JA : Ácido Jasmónico

LOX : Lipoxigenasa

LRR-RLK : *Leucine-Rich Repeats Receptor-Like Kinase*

MAMPs : *Microbe-Associated Molecular Patterns*

MM: MoneyMaker

PAMPs : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PRRs : *Pattern Recognition Receptors*

PRs : *Pathogenesis-Related Proteins*

Ps : *Pseudomonas syringae*

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

PTI : *PAMP Triggered Immunity*

PUFAs : Ácidos grasos poliinsaturados

pv. : Patovar

R : Gen de resistencia

RG : Rio Grande

SA : Ácido Salicílico

SAR : *Systemic Acquired Resistance*

VOCs : *Volatile Organic Compounds*

1.1. Respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos

En la naturaleza, las plantas están expuestas a multitud de estreses de naturaleza biótica y/o abiótica. A este entorno, que en ocasiones puede resultar hostil, se le suma la característica de que son organismos sésiles, por lo que en muchos casos es necesaria la activación de mecanismos de defensa para asegurar su supervivencia.

En el caso concreto del estrés biótico, las plantas se enfrentan a todo tipo de organismos, desde herbívoros (insectos o mamíferos) hasta microorganismos (bacterias, hongos, virus o viroides). El estudio de las interacciones planta-patógeno resulta de gran interés desde ambos puntos de vista, debido a la elevada capacidad de las plantas de evitar enfermedades, a pesar de las diferentes estrategias empleadas por los patógenos para tratar de provocarlas (Abramovitch y Martin, 2004).

Dentro de la respuesta defensiva de las plantas frente al ataque de patógenos podemos encontrar dos tipos de respuestas o barreras defensivas. La primera línea defensiva también denominada defensa pasiva o general, es de tipo constitutivo y está compuesta por una serie de barreras físicas y químicas preexistentes en las plantas de manera natural, tales como la cutícula, la pared celular o la síntesis de metabolitos secundarios (compuestos fenólicos, alcaloides, terpenoides, etc.), que aparte de protegerlas del ataque de patógenos, les confieren fuerza y rigidez.

Además de estas barreras naturales, las plantas cuentan con un segundo nivel defensivo de tipo inducible, que tiene lugar tras la detección por parte de la planta de inductores patogénicos o *elicitors*. Este reconocimiento desencadenaría la activación de toda una serie de respuestas defensivas que incluyen cambios a nivel estructural, bioquímico y metabólico, como la formación de estructuras histológicas de defensa, la producción de compuestos antimicrobianos como fitoalexinas o la síntesis de proteínas de defensa (Cui *et al.*, 2015).

1.1.1. Percepción del patógeno y señalización de la respuesta defensiva

Como se ha citado anteriormente, las plantas son capaces de reconocer toda una serie de inductores patogénicos activándose así la respuesta de tipo inducible. En este tipo de respuesta se han establecido dos niveles o vías de señalización inmune según sea el tipo de reconocimiento: la vía conocida como PTI (*PAMP Triggered Immunity*) que se activa por el reconocimiento inespecífico de los PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*); y la vía que se activa por la percepción de efectores, conocida como ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones y Dangl, 2006; Xin y He, 2013)(Figura 1.1).

Reconocimiento inespecífico: respuesta defensiva activada por PAMPs (PTI)

El primer nivel de respuesta defensiva de tipo inducible de las plantas se basa en la percepción de patrones moleculares conservados asociados a grupos de patógenos (PAMPs), que incluyen proteínas como la flagelina bacteriana, carbohidratos como la quitina fúngica o lipopolisacáridos. Este tipo de respuesta defensiva también puede ser activada por moléculas derivadas de organismos no patogénicos conocidos como MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*) (Boller y Felix,

2009), o por el reconocimiento de productos de degradación de la propia planta ocasionados por el patógeno durante la infección, conocidos como DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*), tales como monómeros de cutina derivados de la cutícula o restos de la pared celular (Serrano *et al.*, 2014).

Se conocen un gran número de *elicitors* capaces de iniciar este tipo de respuesta. En el caso de la bacteria *Pseudomonas syringae*, dos de los *elicitors* más estudiados son la flagelina, en la que el epítopo inmunogénico flg22 es reconocido por el receptor transmembrana FLS2 (Gomez-Gomez y Boller, 2000), y el factor de elongación Tu (EF-Tu), que activa respuestas defensivas similares a flg22, y que es reconocido por el receptor EFR (Jones y Dangl, 2006).

Una vez estas moléculas son reconocidas por los receptores de membrana específicos conocidos como PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), tiene lugar la transducción de la señal defensiva, que activa una serie de cascadas de MAP quinasas y diferentes factores de transcripción. Este fenómeno concluye con la activación de todo un conjunto de respuestas defensivas específicas dirigidas a frenar la actividad del patógeno, tales como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la deposición de callosa, la generación de mensajeros secundarios o la síntesis de proteínas de defensa (*Pathogenesis-Related Proteins*, PRs) (Corwin y Kliebenstein, 2017).

Además, también juega un papel importante la señalización hormonal mediada por diferentes fitohormonas como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) o el etileno (ET), que modulan y dirigen la respuesta defensiva dependiendo del tipo de patógeno al que se enfrenten, ya sea un patógeno de tipo biótrofo, necrótrofo o herbívoro.

Reconocimiento específico: respuesta defensiva activada por efectores (ETI)

Algunos patógenos son capaces de producir efectores, denominados factores de avirulencia (*Avr*), que les permiten superar este primer nivel de respuesta defensiva PTI, ocasionando la susceptibilidad desencadenada por el efector (*Effector-Triggered Susceptibility*, ETS). Por su parte, las plantas han evolucionado sintetizando los productos de los genes de resistencia *R*, estableciéndose un nuevo nivel defensivo, conocido como ETI (*Effector-Triggered Immunity*) que impide el avance de la infección (Figura 1.1 (Jones y Dangl, 2006).

Este modelo de interacción entre un factor codificado por el gen *R* y el factor de avirulencia del patógeno codificado por el gen *Avr* se conoce como interacción *gen-a-gen* (Flor, 1971). Este modelo describe dos tipos de interacciones, la interacción de tipo *compatible* y la de tipo *incompatible*, que determinarán el desarrollo o no de la enfermedad, respectivamente.

En el caso de que se produzca un reconocimiento entre los factores *R* y *Avr*, tendrá lugar la interacción de tipo *incompatible* que conllevará a la activación de la ETI y, por tanto, se desencadenarán toda una serie de respuestas defensivas encargadas de impedir la expansión y colonización por parte del patógeno, que culminarán con la muerte celular alrededor del punto de entrada de éste, dando lugar a la denominada reacción hipersensible (*Hypersensitive Reaction*, HR). Este tipo de resistencia generalmente va acompañado de la activación de una resistencia sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR), que es capaz de mantener la actividad defensiva de la planta frente a posteriores infecciones, confiriéndole así un tipo “memoria defensiva” (Kachroo y Robien, 2013).

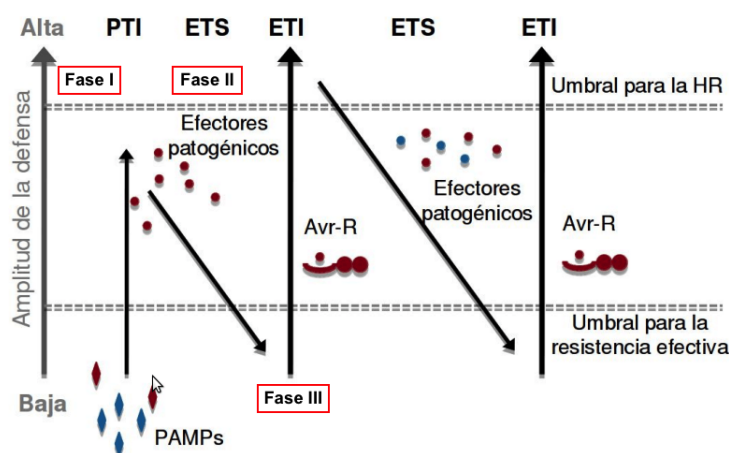


Figura 1.1: Modelo en zig-zag ilustrativo del sistema defensivo de las plantas. En la fase I, la planta reconoce los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de los PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), desencadenando la inmunidad activada por estas moléculas (*PAMPs-Triggered Inminuty*, PTI). En la fase II, algunos patógenos producen efectores que pueden interferir con la PTI ocasionando la susceptibilidad desencadenada por el efector (*Effector-Triggered Susceptibility*, ETS). En la fase III, el factor de avirulencia *Avr* es reconocido por una proteína *R* y se activa la inmunidad ligada al efector (*Effector-Triggered Immunity*, ETI) que suele desencadenar una respuesta hipersensible (HR), produciéndose la muerte celular en el lugar de la infección (Adaptación de Jones y Dangl, 2006).

Cualquier otro tipo de interacción entre ambos factores dará lugar a una interacción de tipo *compatible* y, por tanto, al desarrollo de la enfermedad, produciéndose una infección sistémica por toda la planta que puede llegar a ocasionar su muerte.

Un sistema bien estudiado de reconocimiento *gen-a-gen* es el que se produce entre la variedad de tomate Rio Grande portadora o no del gen de resistencia *Pto*; y la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) que posee el gen de avirulencia *AvrPto* (Ronald *et al.*, 1992) por lo que daría lugar a una interacción de tipo *incompatible*, desencadenándose la ETI y por lo tanto resistiendo eficientemente a la enfermedad.

1.1.2. La respuesta defensiva frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

La bacteria Gram-negativa *Pseudomonas syringae* (*Ps*) es una de las bacterias fitopatogénicas mejor estudiadas y sirve como modelo para el estudio de interacciones planta-patógeno. El interés por esta bacteria radica en que es una de las principales causantes de enfermedades en un amplio rango de especies vegetales de interés agronómico, ocasionando grandes pérdidas económicas a nivel global.

Se trata de una bacteria hemibiótrfica cuyo ciclo infectivo se divide en dos etapas espacial y temporalmente interconectadas entre sí. En la primera fase biótrfica o epífita, el patógeno coloniza la superficie aérea de la planta, generalmente hojas, flores o frutos. La segunda fase sería la etapa necrótrfica o endofítica, donde la bacteria penetra en la planta a través de aperturas naturales o

zonas dañadas y comienza a multiplicarse de manera muy agresiva colonizando el apoplasto (Figura 1.2) (Melotto *et al.*, 2008).

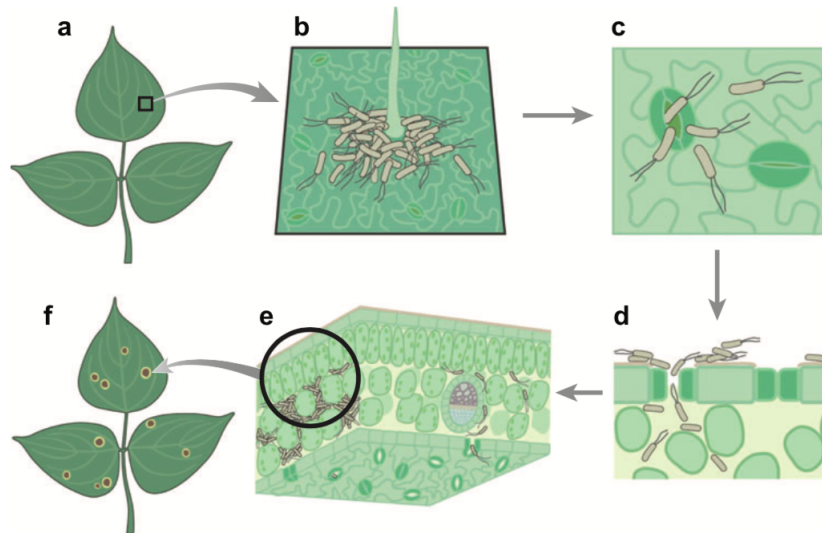


Figura 1.2: Diagrama del ciclo infeccioso de *Pseudomonas syringae*. (a) Hojas sanas. (b) Bacterias en la superficie foliar. (c) Bacterias penetrando por un estoma abierto. (d) Colonización de las bacterias en el apoplasto. (e) Multiplicación bacteriana. (f) Aparición de síntomas, tales como necrosis y clorosis (Melotto *et al.*, 2008)

Se han identificado más de 60 cepas bacterianas de *Ps* diferentes (Bull *et al.*, 2010) y cada una de ellas es capaz de infectar únicamente a un número limitado de especies vegetales, o incluso a ciertos cultivares de una misma especie. El patovar DC3000 de *Ps* fue descrito como un patovar de tomate, aunque también es capaz de infectar a la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (Whalem *et al.*, 1991; Xin y He, 2013), lo que ha permitido estudiar de manera más extensa los mecanismos moleculares de acción de esta cepa en diferentes especies vegetales.

Muchos patógenos foliares, incluidas bacterias como *Ps* invaden y penetran en las plantas a partir de aperturas naturales como pueden ser estomas, por lo que la defensa estomática también tiene un papel importante dentro del sistema inmune de las plantas.

1.2. Regulación estomática en la respuesta defensiva de las plantas

Los estomas son poros microscópicos que se encuentran en la epidermis de las hojas. Son los encargados de controlar el intercambio gaseoso entre la planta y el medio ambiente circundante, jugando un papel esencial en la toma de CO_2 durante la fotosíntesis y en la pérdida de agua durante la transpiración. La regulación de la apertura y cierre estomático depende de varios factores tanto externos como luz, sequía, humedad o concentración de CO_2 , como internos, donde la regulación hormonal tiene un papel clave.

La localización y la fisionomía de los estomas los convierte en una de las principales vías de entrada de un gran número de patógenos, por lo que las plantas han desarrollado la capacidad

de regular el cierre o apertura estomática no solamente en respuesta a diferentes hormonas como el ácido abscísico (ABA) y/o a factores ambientales, sino también en respuesta al ataque de patógenos.

1.2.1. Defensa estomática frente a patógenos

La importancia de la regulación estomática en procesos como la evapotranspiración y la fotosíntesis ha sido ampliamente estudiada. En lo relativo al ataque por patógenos, los estomas se habían descrito simplemente como una vía pasiva para la entrada de diferentes microorganismos, y se pensaba que ni los patógenos invasores ni las plantas poseían ningún tipo de mecanismo que les facilitara o restringiera la entrada a los tejidos internos de la planta, respectivamente.

Sin embargo, se ha demostrado que la entrada y colonización por parte de los patógenos del apoplasto a través de los estomas es un mecanismo mucho más complejo y dinámico, y que las plantas a su vez han desarrollado la capacidad de restringir la entrada a estos microorganismos ya sea cerrando los estomas o inhibiendo su apertura (Arnaud y Hwang, 2015).

***Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 como modelo de inmunidad estomática**

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la bacteria *Pseudomonas syringae* es una de las bacterias fitopatogénicas mejor estudiadas y sirve como modelo en el estudio de diferentes ámbitos en interacciones planta-patógeno, como es el caso de la defensa estomática frente a bacterias.

Se ha observado que la bacteria *Pst* DC3000 es capaz de activar la defensa estomática de la planta tras la detección de *elicitors* patogénicos, induciendo el cierre estomático y por lo tanto limitando la entrada de la bacteria (Melotto *et al.*, 2006). Para que tenga lugar este cierre estomático como respuesta al reconocimiento de PAMPs, es fundamental la acción de dos hormonas que actúan como reguladores positivos del cierre estomático, el SA y el ABA (Figura 1.3).

El SA es la hormona encargada de dirigir y modular la respuesta defensiva de las plantas cuando el atacante es un patógeno de tipo biotrofo (Glazebrook, 2005), como es el caso de *Pst*, por lo que el cierre estomático que tiene lugar tras el ataque de esta bacteria está regulado mayoritariamente por el SA.

El ABA es la hormona clásicamente implicada en el cierre estomático en condiciones de sequía y otros estreses abióticos (Vishwakarma *et al.*, 2017). Sin embargo, en lo que respecta al estrés biótico y concretamente a la infección con *Pst*, se cree que esta hormona juega dos roles diferentes dependiendo de la fase del ciclo infectivo en la que actúe. De esta manera, durante la fase pre-invasiva o biotrofa el ABA es capaz de inducir el cierre estomático y, por tanto, aumentar la resistencia de la planta frente a la infección. Sin embargo, durante la fase necrotrofa, una vez que la bacteria ya hubiera colonizado el interior de la planta y se multiplicara por el apoplasto, esta hormona actuaría promoviendo la susceptibilidad frente a la infección (Zeng y He, 2010; Lim *et al.*, 2014).

Las rutas de señalización de ambas hormonas funcionan en paralelo pero de manera independiente, por lo que cualquier perturbación en alguna de estas rutas supondría alteraciones en la inmunidad estomática, comprometiendo así la respuesta conocida como PTI y, por lo tanto, la

supervivencia de la planta (Arnaud y Hwang, 2015).

Por su parte, la bacteria *Pst* es capaz de superar esta primera línea defensiva de las plantas mediante la generación de factores de virulencia que ocasionan la reapertura estomática, como es el caso de la coronatina (COR). Esta fitotoxina mimetiza a la forma activa del ácido jasmónico, JA-Ile, y es capaz de unirse al receptor de esta hormona y, por lo tanto, activar la señalización del JA. Debido a la relación antagónica que existe entre el SA y el JA, la coronatina actuaría como supresora del cierre estomático a través del bloqueo del cierre estomático inducido por SA, produciéndose así una reapertura estomática (Figura 1.3) (Zheng *et al.*, 2012; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2017).

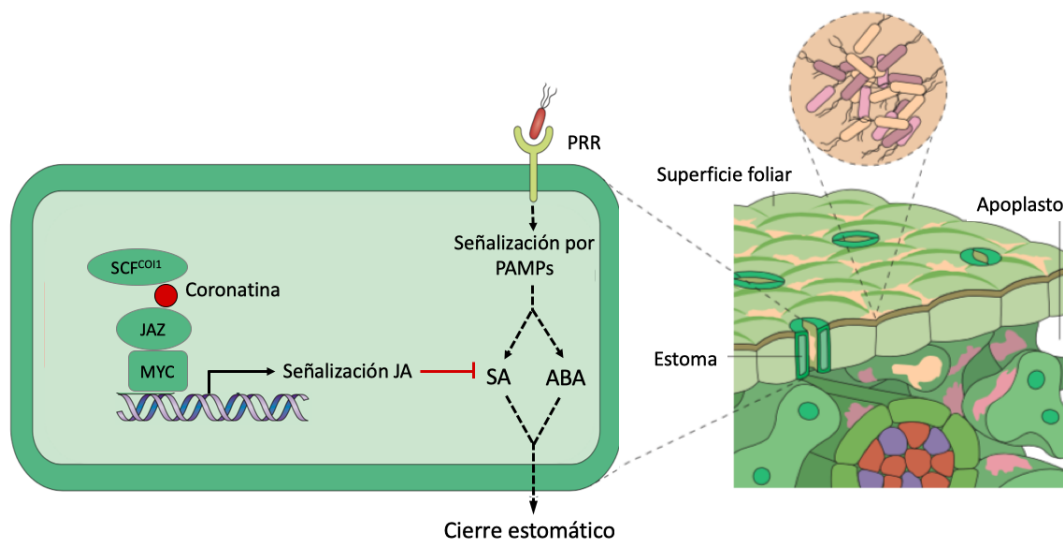


Figura 1.3: Señalización de la regulación estomática tras la infección con *Pseudomonas syringae*. Una vez la bacteria penetra en la planta a través de los estomas, diferentes elicitors bacterianos (PAMPs) activan la respuesta defensiva PTI que induce el cierre de estomas mediado por las vías señalización hormonal del SA y el ABA. Para contrarrestar este fenómeno, la bacteria *Pst* produce la fitotoxina coronatina que activa la señalización del JA. La activación de la señalización regulada por JA inhibe la acción del SA y el ABA, produciéndose la reapertura estomática (Adaptación de Xin *et al.*, 2018).

A pesar de los últimos avances en el estudio de la defensa estomática frente a patógenos, resulta de gran interés el estudio de las diferentes rutas de señalización implicadas en la regulación de la apertura o cierre estomático, así como en el posible *crossstalk* que pueda darse entre ellas o la penalización que puede tener la activación de estos mecanismos defensivos en el crecimiento y desarrollo de la planta.

1.3. El papel de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en el sistema defensivo de las plantas

Dentro de los mecanismos más importantes y sofisticados de la respuesta defensiva de las plantas, cabría destacar la síntesis *de novo* de una gran variedad de metabolitos secundarios encargados de protegerlas frente a todo tipo de estreses tanto bióticos (herbívoros, bacterias, virus,

SECCIÓN 1.3. *El papel de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en el sistema defensivo de las plantas*

hongos, etc) como abióticos (sequía, salinidad, etc) (Kliebenstein, 2012).

Dentro de este amplio grupo de metabolitos secundarios, se encuentran los compuestos orgánicos volátiles (*Volatile Organic Compounds*, VOCs). Estos VOCs son generalmente líquidos de naturaleza lipófila con alta presión de vapor y bajo peso molecular, lo que les permite atravesar libremente membranas celulares y así liberarse al medio que les rodea (Dudareva *et al.*, 2006; Pichersky *et al.*, 2006). Se han identificado alrededor de 1700 compuestos volátiles pertenecientes a más de 90 especies vegetales, lo que constituye aproximadamente el 1 % de los metabolitos secundarios conocidos en plantas (Duradeva *et al.*, 2013).

A pesar de su enorme diversidad, la biosíntesis de la mayoría de estos compuestos deriva de unos pocos precursores del metabolismo primario, definiéndose así cuatro vías biosintéticas: vía del shikimato, del metileritritol fosfato (MEP), del ácido mevalónico (MVA), y de las lipooxigenasas (LOX). Atendiendo a este criterio, los VOCs se pueden clasificar en varios grupos, en los que se incluirían terpenos, fenilpropanoides/bencenoides, y derivados de ácidos grasos. Estos últimos se subdividen a su vez en volátiles de hoja verde (*Green Leaf Volatiles*, GLVs) y derivados del metil jasmonato, además de toda una serie de compuestos específicos de distintas especies que no se podrían clasificar dentro de estas clases principales (Duradeva *et al.*, 2013).

En este proyecto, nos centraremos en los compuestos derivados de la ruta de las lipoxigenasas, concretamente en los GLVs.

1.3.1. Green Leaf Volatiles (GLVs)

Los GLVs son aldehídos y/o alcoholes de 6 átomos de carbono, y sus respectivos ésteres, que se sintetizan a partir de los ácidos linoleico y linolénico, a través de la ruta de las oxilipinas o lipooxigenasas. Estos ácidos grasos entran en la ruta de las oxilipinas por la acción de las lipasas, donde se convierten en sustratos de las LOXs. Según la posición del carbono sobre el que actúan, C9 o C13, las LOXs pueden clasificarse en 9-LOX y 13-LOX, respectivamente. Los GLVs se sintetizan a partir de la vía 13-LOX para dar lugar a 13-hidroperóxidos que se escindirán mediante la acción de la hidroperóxido liasa (HPL) para dar lugar al (*Z*)-3-hexenal (Duradeva *et al.*, 2013; Scala *et al.*, 2013).

Estos aldehídos C6 pueden transformarse en los correspondientes alcoholes y ésteres a través de la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y alcohol aciltransferasa (AAT), respectivamente (Figura 1.4) (D'Auria *et al.*, 2006; Matsui *et al.*, 2006).

En concreto, los ésteres derivados del (*Z*)-3-hexenol, tales como el propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP) o el butanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HB) en los que se centra este trabajo, se sintetizarían a partir la transformación del (*Z*)-3-hexenal en (*Z*)-3-hexenol, para finalmente esterificarse por la acción del enzima AAT con los ácidos propiónico y butírico, respectivamente.

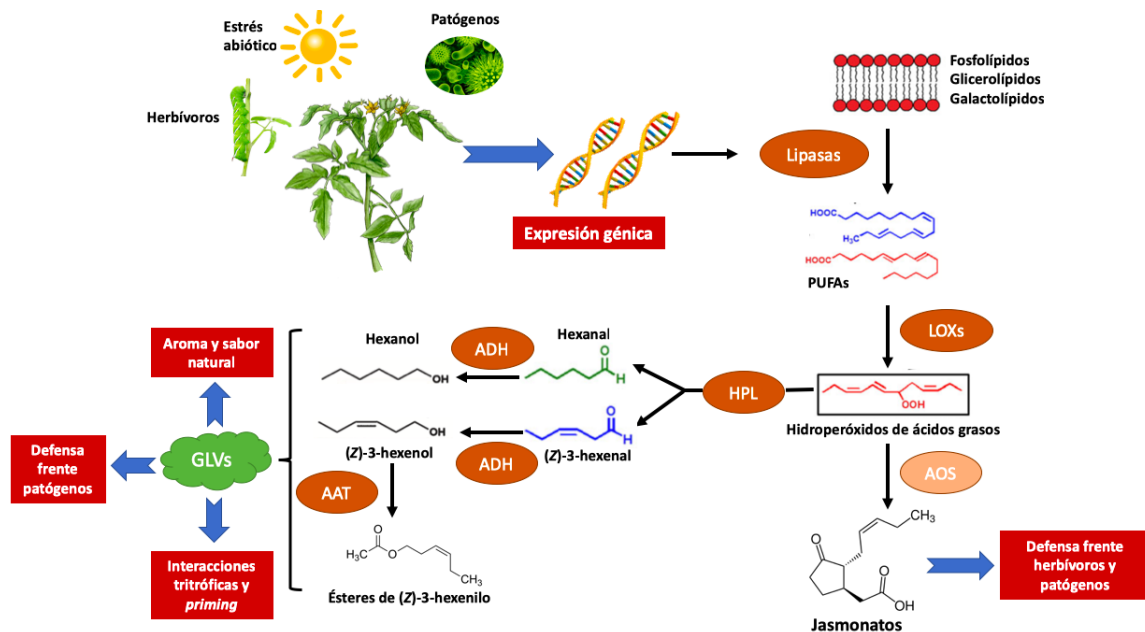


Figura 1.4: Ruta de biosíntesis de GLVs. Una vez los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs; ácido linoleico y linoleico), precursores de la síntesis de VOCs, entran en la ruta de las lipoxigenasas (LOXs), actúan una serie de enzimas como la hidroperóxido liasa (HPL), alcohol deshidrogenasa (ADH) y alcohol aciltransferasa (AAT) para dar lugar a la formación de GLVs (Adaptación de ul Hassan *et al.*, 2015).

1.3.2. VOCs en la interacción planta-patógeno

Varios estudios han demostrado que un gran número de VOCs se sintetizan como respuesta a diferentes tipos de estreses, por lo que juegan un papel importante en la respuesta defensiva de las plantas (ul Hassan *et al.*, 2015).

La emisión de compuestos volátiles por parte de la planta puede ser de tipo constitutivo o inducible en respuesta a una gran variedad de estreses de tipo biótico o abiótico. Respecto al estrés biótico, se ha descrito que estos compuestos volátiles están implicados en la respuesta defensiva frente al ataque de herbívoros y patógenos. Estos volátiles pueden actuar de manera directa si actúan sobre el patógeno dañándolo, o de manera indirecta actuando como elicitores y activando el sistema defensivo de las plantas, ya sea en la misma planta o actuando sobre las plantas vecinas (Figura 1.4) (Niinemets *et al.*, 2013).

El papel defensivo de los VOCs se ha descrito principalmente en la respuesta defensiva de las plantas frente a herbívoros ya sea por su toxicidad, actuando como repelente, o incluso por su capacidad de atraer a sus depredadores naturales (Heil, 2014). A pesar de que el papel defensivo de los VOCs frente a patógenos ha quedado en segundo plano, se ha observado que ciertos volátiles son emitidos por las plantas tras haber sido atacadas por hongos y bacterias principalmente (Spinellic *et al.*, 2010; Toome *et al.*, 2010; Ameye *et al.*, 2017). Una de las interacciones más estudiadas es la que se produce tras la infección con distintas cepas de la bacteria *Pseudomonas syringae* de diferentes especies como tabaco, pimienta, tomate y la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Algunos de los compuestos inducidos comunes en este tipo de infección bacteriana son diferentes monoterpenos, sesquiterpenos y otros volátiles como el metil salicilato y el indol (Huang *et al.*,

SECCIÓN 1.3. *El papel de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en el sistema defensivo de las plantas*

2003; 2008).

En nuestro laboratorio se llevó a cabo un análisis metabolómico diferencial mediante cromatografía gaseosa (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) de plantas de tomate de la variedad Rio Grande (RG) con el gen de resistencia *Pto*, infectadas tanto con la cepta virulenta como avirulenta de la bacteria *Pst* DC3000. La comparación de ambos perfiles metabolómicos reveló una serie de compuestos volátiles que se acumulan de manera diferencial en cada una de las interacciones. En el caso de la infección avirulenta, es decir, cuando la planta es capaz de hacer frente al ataque bacteriano asegurando la supervivencia de la planta, se emitían de manera diferencial compuestos volátiles ésteres del (*Z*)-3-hexenol y algunos monoterpenos hidroxilados (López-Gresa *et al.*, 2017).

2

Objetivos

En nuestro laboratorio se identificaron diferentes ésteres del (Z)-3-hexenol, tales como el acetato, el propanoato, el butanoato y el isobutanoato de (Z)-3-hexenilo, que son emitidos de manera diferencial por plantas de tomate cuando éstas resisten eficazmente a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Dentro de estos compuestos, destaca el butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) ya que tratamientos exógenos con este éster ocasionan una inducción de proteínas y metabolitos defensivos, así como claro cierre estomático, aumentando así la resistencia frente a la infección bacteriana.

En el presente Trabajo Fin de Máster se pretende estudiar el mecanismo de acción del HB, así como explorar su posible aplicación en agricultura. Para ello, se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- I . Estudio del papel del cierre estomático mediado por HB en la inducción de resistencia de plantas de tomate frente a la infección bacteriana con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.
- II . Estudio de la implicación de las moléculas señal defensivas, como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) o el ácido abscísico (ABA), en la cascada de transducción mediada por HB.
- III . Estudio de los cambios a nivel transcriptómico de plantas de tomate tratadas con HB mediante la tecnología RNA-Seq.
- IV . Estudio del posible uso de HB frente a otro tipo de estreses en los que sea clave el control el cierre estomático, tales como estrés hídrico.
- V . Estudio del potencial del uso del HB en agricultura, mediante la determinación de la duración y el máximo de su efecto, y el estudio de la eficacia del HB en diferentes especies vegetales de interés agronómico.

3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Para la realización del presente trabajo se emplearon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de las variedades Flora-Dade (FD); *NahG* (Brading *et al.*, 2000) y su parental MoneyMaker (MM); y Rio Grande (RG), la única variedad que contiene el gen de resistencia *Pto*.

3.1.1. Germinación de semillas

Las semillas de tomate se germinaron mediante cultivo *in vitro*. Fueron esterilizadas con una mezcla de agua y lejía 1:1 con 3-4 gotas del detergente Tween20 durante 30 minutos, y a continuación se realizó una serie de lavados con agua destilada durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente. Una vez esterilizadas, las semillas se sembraron en placas Petri de 14 cm de diámetro con papel de filtro y agua destilada. Para mantener las condiciones de asepsia, todo este proceso se llevó a cabo en cabinas de flujo laminar. Una vez sembradas, las placas permanecieron en la cámara de cultivo *in vitro* a 24°C durante 48 h de oscuridad y otras 48 h en presencia de luz, y finalmente fueron transferidas a tierra.

3.1.2. Condiciones normales de cultivo

Una vez germinadas las semillas, se colocaron en macetas de 12 cm de diámetro que contenían una mezcla de turba y perlita 1:1 y fueron cultivadas en el invernadero a una temperatura entre 18-25°C, con una humedad relativa del 50-70 %, un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) y un riego constante.

En el caso de las plantas sometidas a estrés hídrico se detuvo el riego el día indicado.

3.2. Tratamiento con butanoato de (Z)-3-hexenilo

3.2.1. Tratamientos en cámaras de metacrilato

Los tratamientos con HB en cámaras de metacrilato se llevaron a cabo utilizando plantas de tomate de la variedad FD de entre 21 y 30 días. Para ello, se colocaron entre 3 y 6 plantas en cámaras de metacrilato de 110 L. El volumen correspondiente a una concentración de 5 μ M fue distribuido entre varios algodoncillos hidrofílicos, y se utilizó agua destilada en el caso de las plantas control.

Las cajas fueron selladas con vaselina y precintadas con papel de film transparente y cinta adhesiva durante 24 h, asegurando así una atmósfera cerrada y uniforme.

3.2.2. Tratamientos por pulverización en diferentes especies vegetales

Plantas de las especies vegetales *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Zea mays* and *Citrus x jambhiri* también fueron tratadas con HB por pulverización. En este caso, los tratamientos se llevaron a cabo pulverizando al menos 9 plantas de las diferentes especies vegetales a una concentración de HB de 2 mM y 0.05 % del detergente Tween20. Se trataron también plantas de tomate como control positivo con la misma concentración.

3.3. Material microbiológico, infección y conteo bacteriano

Las bacterias utilizadas en el presente trabajo fueron *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) y la cepa *Pst* DC300 Δ *avrPto*/ Δ *avrPtoB* que tiene deletados los genes *AvrPto* y *AvrPtoB* (Lin y Martin, 2005; Ntoukakis *et al.*, 2009).

3.3.1. Preparación del inóculo bacteriano

La bacteria fue cultivada durante 48 horas a 28°C en placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían medio LB agar con los antibióticos correspondientes: rifampicina (10 mg/mL) y kanamicina (0.5 mg/mL) en el caso de la cepa *Pst* DC3000; rifampicina (10 mg/mL), kanamicina (0.5 mg/mL) y espectinomicina (10 mg/mL) para la cepa *Pst* DC3000 Δ *avrPto*/ Δ *avrPtoB*.

Una vez aumentó el número de colonias, éstas se sembraron en 3 mL de medio King B líquido con rifampicina y se dejaron crecer toda la noche en agitación a 28°C. Tras 24h en agitación, el cultivo bacteriano se transfirió a un 14 mL de King B líquido y el número de colonias (unidades formadoras de colonias, CFU) aumentó bajo las mismas condiciones que el paso anterior. Posteriormente, el cultivo bacteriano resultante fue centrifugado durante 15 minutos a 3000 rpm y el sedimento fue resuspendido en *MgCl*₂ 10 mM estéril. Con la ayuda de un espectrofotómetro, se midió la absorbancia a 600 nm del cultivo bacteriano y se fue diluyendo con *MgCl*₂ 10 mM estéril hasta conseguir un inóculo final con una densidad óptica de 0.1 nm, que corresponde a una concentración de 5×10^7 CFU/ml aproximadamente.

3.3.2. Infección bacteriana

La inoculación bacteriana se llevó a cabo en plantas de tomate de unos 25-30 días por dos métodos diferentes: inyección e inmersión, a la misma concentración bacteriana. En el caso de infección mediante inmersión, las plantas fueron sumergidas en la suspensión bacteriana con 0.05 % de Silwet L-77. En la infección bacteriana mediante inyección, se inocularon todos los folíolos de la 3^o y 4^o hoja con la ayuda de una jeringuilla, inyectando la suspensión bacteriana en diferentes partes de la parte abaxial de la hoja.

3.3.3. Conteo bacteriano en hojas de tomate

El conteo bacteriano consiste en realizar un recuento de las unidades formadoras de colonias (CFU) presentes en el material vegetal infectado. Para llevarlo a cabo, se tomaron 3 discos de 0,95 cm² de folíolos infectados de cada planta con ayuda de un sacabocados. Se utilizaron al menos 3 plantas por tratamiento o variedad de tomate. Los discos fueron sumergidos en *MgCl*₂ 10 mM y fueron triturados en el homogeneizador *TissueLyser II* (Qiagen). El conteo de poblaciones bacterianas se determinó realizando diluciones seriadas 1:10 del material infectado y homogeneizado, y sembrándolas en placas que contenían King B agar suplementado con rifampicina. Tras la incubación de las placas a 28°C durante 48 h, se realizó el recuento de colonias aisladas formadas con la ayuda de un contador de colonias (Selecta; Vidrafoc).

3.4. Medidas de apertura estomática

En primer lugar, se obtuvieron moldes de la parte abaxial de los folíolos colocando una capa fina de pegamento universal (Imedio, Bolton Group, Madrid, Spain) y una vez seco, despegándolo cuidadosamente con la ayuda de unas pinzas. Para observar los estomas detalladamente, se cortaron secciones planas de cada uno de los moldes y se colocaron en un portaobjetos e hidrataron con agua para visualizarlos finalmente en un microscopio Leica DC5000 (Leica Microsystems S.L.U.). Se tomaron varias fotos de diferentes regiones de las hojas de tomate y fueron posteriormente analizadas con el programa de análisis de imagen *ImageJ*. Se midió el alto y ancho de al menos 50 estomas por folíolo, por tipo de tratamiento y por variedad de planta de tomate de al menos 3 plantas independientes, obteniendo así el ratio medio de apertura estomática de cada muestra (Figura 3.1). De esta forma, ratios cercanos a 1 corresponderían a estomas abiertos y próximos a 0 a estomas cerrados.

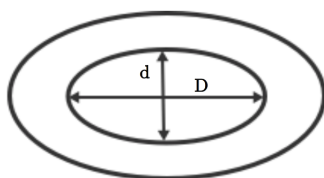


Figura 3.1: Representación de la medida del ancho (D) y el alto (d) de un estoma tipo.

3.5. Medidas de conductividad por fuga de electrolitos

Se tomaron 5 discos de 0.95 cm^2 de al menos 3 plantas control y plantas sometidas a sequía con la ayuda de un sacabocados y se sumergieron en 10 mL de agua mili-Q (2 mL/disco). A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos que consistían en decantar el agua existente y volver a añadir la misma cantidad en cada lavado. Una vez efectuados los 3 lavados, los discos se dejaron en agitación durante 3 h y se procedió a medir la conductividad de cada una de las muestras utilizando un conductímetro portátil 4120410 (Selecta). Por último, las muestras se hirvieron en un baño maría a 100°C durante 1 h con el fin de obtener la conductividad máxima de cada una de ellas.

3.6. Toma de muestra

Los folíolos de las hojas de tomate utilizados en cada uno de los experimentos se obtuvieron de la 3ª y 4ª hoja de cada planta de tomate. Cada folíolo o pareja de folíolos de cada hoja fueron empleados para un experimento determinado. En el caso de los experimentos de análisis de la expresión génica, los folíolos seleccionados correspondieron a la zona más próxima al tallo (d y e), se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido y finalmente fueron almacenados a -80°C hasta su posterior uso. Para el análisis de apertura estomática siempre se recogió el folíolo del extremo (a). Por último, para los experimentos de conteo bacteriano y conductividad se tomaron los folíolos de la zona intermedia (b y c) (Figura 3.2).

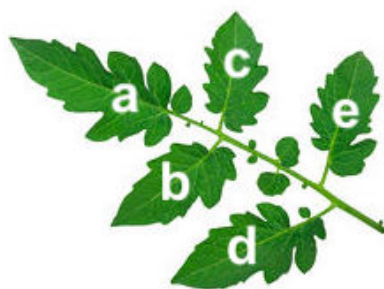


Figura 3.2: Representación de una hoja compuesta de tomate. A cada folíolo de la 3^a y 4^a hoja le corresponde una letra, siendo (a) el folíolo del extremo, (b) y (c) los folíolos intermedios y (d) y (e) aquellos que se encuentran más próximos al tallo

3.7. Análisis cuantitativo de transcritos mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR)

3.7.1. Extracción y cuantificación del RNA total

La extracción de RNA de hojas de tomate se llevó a cabo utilizando el reactivo *Trizol*[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. Una vez extraído, se precipitó el RNA añadiendo un volumen de LiCl 6M durante un periodo de 3h. A continuación el precipitado se lavó con LiCl 3M y la muestra se resuspendió en 44 μ L de H_2O DEPC (Dietilpirocarbonato).

Para eliminar posibles contaminantes de DNA genómico, se realizó un tratamiento con el enzima DNasa, utilizando para ello 2U/ μ LRNA del kit comercial TURBO DNase (Ambion Austin, TX, United States). Para obtener cDNA a partir de RNA, se utilizó el kit comercial *PrimeScript*[™] RT Reagent Kit (Perfect Real Time, Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Para la cuantificación del RNA extraído se empleó un espectrofotómetro ultravioleta-visible *Nanodrop*[®] ND-1000, calibrado con un blanco de H_2O DEPC. La concentración de RNA se calculó midiendo a una absorbancia a 260 nm. Todos los RNAs utilizados presentan valores comprendidos entre 1.8-2.0 para ratios de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, lo que indicaría una buena calidad de la muestra.

3.7.2. Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)

Este ensayo se llevó a cabo con el reactivo de *SYBR*[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para ello se empleó una placa de 96 pocillos *MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate* (Applied Biosystems), añadiéndose 10 μ L a cada pocillo.

La amplificación fue monitorizada a tiempo real con el sistema de PCR en tiempo real 1500 Fast (Life Technologies). Como control positivo del experimento, se utilizó en todos los casos el gen actina. Se realizaron 3 repeticiones técnicas de cada réplica biológica de cDNA. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se recogen en la Tabla S1 (Anexo).

3.8. Análisis transcriptómico mediante secuenciación de RNA (RNA-Seq)

El RNA de las muestras fue analizado en el equipo Agilent 2100 *Bioanalyzer* (Servicio de Genómica del IBMCP). Una vez asegurada la calidad y la integridad del RNA de las muestras, se enviaron a la empresa Genomics4All (Campus de Montegancedo, 28223, Madrid) para su secuenciación por RNA-Seq y para el análisis bioinformático de los datos obtenidos.

3.9. Análisis de compuestos volátiles mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para llevar a cabo el análisis de compuestos volátiles se introdujeron 100 mg de hoja de tomate totalmente homogeneizada en un vial de vidrio de 7 mL, añadiéndole a continuación 1 mL de una solución de $CaCl_2$ saturada y 100 μ L de EDTA 750 mM a pH 7.5. El vial se cerró herméticamente y fue sonicado durante 5 minutos. La técnica de extracción de los compuestos volátiles empleada fue la microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME, *Head Space Solid-Phase Microextraction*) (López-Gresa et al., 2017). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 50 °C y el proceso de extracción se realizó a la misma temperatura durante 20 minutos con una fibra PDMS/DVB (Supelco, Bellefonte, PA, USA). La desorción de los compuestos adheridos a la fibra se llevó a cabo durante 1 minuto a 250 °C. La microextracción en fase sólida se realizó utilizando un automuestreador CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland).

Los VOCs fueron analizados con la ayuda de un cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Santa Clara, CA, USA) acoplado a un detector de masas Agilent 5975B Inert XL de impacto electrónico (IE) con una energía de ionización de 70 eV y una temperatura de fuente de 230 °C. La cromatografía se llevó a cabo en una columna capilar de sílice (60m de longitud, 0.25 mm I.D, 1 μ m de grosor). Las condiciones de temperatura del horno fueron de 40 °C durante 2 minutos y una rampa de 5 minutos a una temperatura constante de 250 °C. El gas portador fue helio a un flujo constante de 1.2 mL/min. La toma de datos se llevó a cabo a 6 *scans* por segundo en un rango *m/z* de 35-250. Los cromatogramas y espectros de masas fueron procesados con la ayuda del software *Enhanced ChemStation* (Agilent).

La identificación de los compuestos se realizó empleando compuestos comerciales que sirvieron como patrones. Los compuestos usados como referencia o estándar fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) o sintetizados químicamente por el servicio de Metabolómica del IBMCP como es el caso de los ésteres de (*Z*)-3-hexenol (Gonzalez- Mas et al., 2011). La cuantificación de HB se realizó mediante curvas de patrón utilizando estos compuestos puros.

3.10. Análisis estadístico y bioinformático

Una vez realizado el análisis bioinformático de los datos de RNA-Seq, se procedió a validar aquellos genes que fueran estadísticamente más significativos y relevantes para este estudio. La secuencia de nucleótidos de cada gen se descargó de la web Sol Genomics (SGN, <http://solgenomics.net>) y se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen empleando la herramienta PrimerQuest (Integrated DNA Technologies). La validación se llevó a cabo mediante

qRT-PCR siguiendo el mismo procedimiento especificado en el apartado 3.7.2. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en los análisis de expresión génica se muestran en la Tabla S1 (Anexo). Para llevar a cabo la visualización e interpretación de los datos ómicos, se emplearon las herramientas del software PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, <http://pantherdb.org>).

En lo referente al análisis estadístico, se realizaron dos tipos de análisis. Para comparar dos grupos de muestras se llevó a cabo una prueba *t* de Student utilizando las herramientas estadísticas incluidas en el programa MS Excel de la *suite* Microsoft Office. Para comparaciones entre más de dos grupos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA), mediante el programa SPSS v.19 (IBM). En ambos tipos de análisis un *p-value* < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

4.1. Antecedentes

En nuestro laboratorio se realizó, mediante cromatografía gaseosa (GC) acoplada a la espectrometría de masas (MS), un análisis metabolómico diferencial dirigido a VOCs de la respuesta defensiva de hojas de plantas de tomate Rio Grande *Pto* infectadas con dos cepas de la bacteria *Pseudomonas syringae* portadoras o no del gen *AvrPto*.

La comparación de los perfiles metabolómicos entre ambos tipos de infección desveló una serie de compuestos volátiles que se acumulaban de forma diferencial en cada interacción. Se observó que la activación de ETI en la planta, que tiene lugar cuando la infección es avirulenta, lleva consigo la emisión diferencial de ésteres del (*Z*)-3-hexenol, tales como el acetato de (*Z*)-3-hexenilo (HA), propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HiB) y butanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HB), y algunos monoterpenos hidroxilados, como el α -terpineol, 4-terpineol y el linalool.

Se realizó una primera validación de este estudio metabolómico dónde se examinó la inducción causada por la infección bacteriana de varios genes que participan en la biosíntesis de los compuestos volátiles diferencialmente emitidos. Mediante el análisis por qRT-PCR se observó una correlación positiva entre los niveles de estos VOCs y el patrón de inducción de genes clave en la biosíntesis de GLVs, como las lipoxigenasas y la alcohol aciltransferasa (AAT) en las muestras infectadas, siendo sus niveles mayores durante el establecimiento de ETI. Nuestros resultados parecen indicar que estos VOCs podrían tener un papel defensivo (López-Gresa *et al.*, 2017).

Para confirmar el papel defensivo de estos ésteres, se evaluaron tanto sus propiedades defensivas directas (antibacterianas y/o antioxidantes), como su papel defensivo indirecto. Para ello, se realizaron tratamientos exógenos de plantas de tomate y se analizaron diferentes aspectos como la resistencia o susceptibilidad a la infección bacteriana, la acumulación de compuestos señalizadores, la inducción de proteínas de defensa o el efecto sobre el cierre estomático (Payá, 2017; López-Gresa *et al.*, 2018). De entre estos ésteres, cabe destacar el butanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HB) que tras ser aplicado directamente sobre plantas de tomate, no sólo produjo la inducción de proteínas, sino que también produjo un claro cierre de los estomas, produciendo así un aumento de la resistencia frente a la infección bacteriana (Anexo Figura S1). Dicho compuesto ha sido patentado por estas características (Lisón *et al.*, 2017).

En este trabajo se pretende profundizar en el mecanismo de acción del compuesto HB, con el fin de conocer y potenciar su papel en el cierre estomático. Asimismo se intentará buscar posibles aplicaciones que pueda tener en agricultura para la mejora de cultivos de interés agronómico frente a diferentes tipos de estreses.

4.2. Mecanismo de acción del butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB)

4.2.1. Modo de acción del HB como inductor de resistencia frente a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio, se observó que diferentes ésteres de GLVs, entre los que se encontraba HB, eran capaces de inducir la expresión del gen *PRI* (Tornero *et al.*, 1993), marcador de la respuesta defensiva frente a patógenos biótrofos, así como inducir el cierre estomático, produciendo una mayor resistencia frente a la infección con *Pst* (Payá, 2017; López-Gresa *et al.*, 2018) (Anexo Figura S1).

Para averiguar el modo de acción de HB en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos, se decidió estudiar si la mayor resistencia frente a la infección bacteriana se debía principalmente al cierre estomático o si otros factores, tales como la inducción de *PRI*, también participaban en este mecanismo defensivo. Para ello, se infectaron plantas de tomate Flora-Dade tratadas o no con HB mediante dos métodos, inmersión e inyección. La inoculación mediante inmersión simula mejor el modo de penetración de la bacteria tal y como ocurre la infección en la naturaleza, esto es, a través de los estomas. Por su parte, la inoculación por inyección es un método mucho más agresivo que sobrepasa la defensa estomática, penetrando la bacteria directamente en el apoplasto.

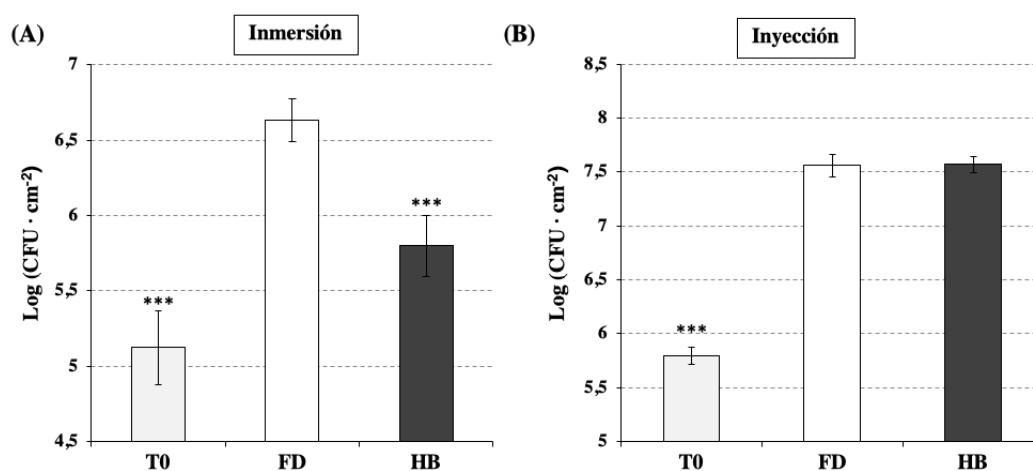


Figura 4.1: Crecimiento de *Pst* en hojas de plantas de tomate Flora-Dade, tratadas o no con HB tras inoculación bacteriana mediante inmersión (A) e inyección (B). El recuento de unidades formadoras de colonias (CFU) se realizó 24 h después de la inoculación bacteriana. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de 6 plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un *t*-test con los datos de cada uno de los tres experimentos independientes. El triple asterisco (***) indica que existen diferencias significativas con un *p*-value < 0.001.

Como se aprecia en la figura 4.1, las plantas que fueron infectadas mediante inyección presentan mayores niveles de crecimiento bacteriano, tal y como cabría esperar. Por otra parte, se aprecia que las plantas que fueron previamente tratadas con HB e infectadas mediante inmersión presentan mayor resistencia que aquellas no tratadas (Figura 4.1A), mientras que en el caso de las plantas inyectadas, los niveles de crecimiento bacteriano en ambos casos son similares (Figura 4.1B). Estos resultados parecen indicar que la resistencia inducida por HB se debe principalmente

al cierre estomático y no a otros factores como la inducción de genes de resistencia.

Varios estudios han demostrado el papel defensivo de diferentes compuestos volátiles frente a esta bacteria. Podríamos destacar el aumento de resistencia frente a *Pst* en plantas de pepino tras realizar tratamientos con 3-pentanol y 2-butanona (Song y Ryu, 2013); o tratamientos con un precursor de etileno, el ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) en plantas de *Arabidopsis* (Pieterse *et al.*, 1998). En el caso concreto de los GLVs, se ha demostrado su papel defensivo sobre todo en los casos de infección por hongos (Scala *et al.*, 2013). Cabría destacar el aumento de resistencia de plantas de *Arabidopsis* tratadas con (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenal o (*Z*)-3-hexenol frente al hongo *Botrytis cinerea* (Kishimoto *et al.*, 2008); o el caso del hongo *Puccinia* que al igual que *Pst* penetra en la planta a través de los estomas, y donde se ha descrito que diferentes metabolitos fúngicos modulan el comportamiento estomático (Grimmer *et al.*, 2012; Murata *et al.*, 2015).

Todos estos estudios, junto con nuestros resultados, demuestran el papel de los GLVs en la respuesta defensiva y podrían sugerir que también podrían jugar un papel importante en la defensa estomática frente a hongos.

4.2.2. Estudio de la señalización de la respuesta defensiva inducida por HB

Una vez confirmado que el papel de HB en la inmunidad estomática, se postuló la idea de si este GLV actuaba a través de la activación de alguna de las rutas de señalización de la respuesta defensiva. Para ello, se estudió si HB así como otros GLVs seleccionados en trabajos anteriores del laboratorio, eran capaces de inducir la expresión de diferentes genes marcadores de rutas defensivas. Para el estudio de la señalización mediada por JA se emplearon distintos genes de la familia *JAZ* (Ishiga *et al.*, 2013) y *TCI21*, que es inducido en plantas de tomate tratadas con metil jasmonato (MJ) (Lisón *et al.*, 2006). También se analizaron diferentes genes marcadores de la hormona implicada en el cierre estomático por excelencia, el ABA, como *RAB18* y *P5CSI* (Gonzalez-Guzman *et al.*, 2014). Se observó que ninguno de estos genes marcadores era inducido por HB y que incluso los genes implicados en la señalización por JA se veían reprimidos (Anexo Figura S2).

Por otra parte, el SA está implicado en la respuesta defensiva de las plantas frente al ataque de patógenos de tipo biótrofo y hemibiótrofo tales como *Pst*, además de actuar como regulador positivo de la defensa estomática (Panchal y Melotto, 2017). Estos motivos, junto con el hecho de que HB produce la inducción de *PRI* (Payá, 2017; López-Gresa *et al.*, 2018; Anexo Figura S1), marcador de la respuesta mediada por SA, nos hizo considerar la posibilidad de que el cierre estomático inducido por HB fuera dependiente del SA. Así pues, se estudió el efecto de este compuesto en plantas de tomate *NahG*, que son plantas incapaces de acumular SA (Brading *et al.*, 2000).

Para ello, plantas de tomate *NahG* y su parental MoneyMaker fueron pre-tratadas con HB durante 24 h y posteriormente infectadas con *Pst*. Tras la inoculación se procedió a analizar el ratio de apertura estomática y el crecimiento bacteriano.

Como muestra la figura 4.2 las plantas *NahG* tratadas con HB mostraron resultados similares tanto en el cierre estomático como en el crecimiento bacteriano a su parental MoneyMaker, indicando que el efecto de HB es independiente de SA.

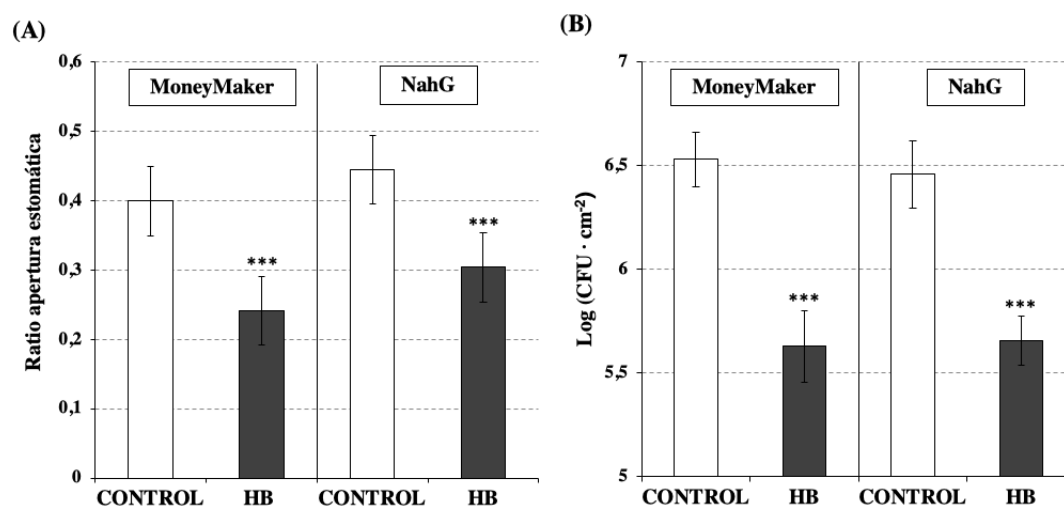


Figura 4.2: Efecto del tratamiento con butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) en plantas de tomate MoneyMaker y NahG. (A) Ratio de apertura estomática de plantas tratadas (HB) o no (CONTROL) con HB. (B) Crecimiento de *Pst* en hojas de tomate tratadas o no con HB. Las muestras fueron tomadas 24 h después de los tratamientos para analizar la apertura estomática. El crecimiento de *Pst* fue evaluado 24 h después de la infección. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de 5 plantas independientes de un experimento representativo. El triple asterisco (***) indica que existe una diferencia significativa de las plantas pre-tratadas con HB respecto a las plantas control, con un *p*-value < 0.001.

Resultados similares se han observado con los precursores de estos compuestos volátiles en *Arabidopsis*, donde se ha demostrado que tratamientos con los sustratos de las enzimas LOX o con sus productos inducen el cierre estomático de manera independiente de ABA, y que el gen *LOX1* que codifica para la lipoxigenasa-9 es necesario para llevar a cabo el cierre estomático en respuesta a la bacteria (Montillet *et al.*, 2013).

4.2.3. Estudio del cierre estomático y acumulación de HB asociado al establecimiento de ETI

Tal y como se ha mencionado en el apartado de Antecedentes, en nuestro laboratorio se observó que plantas de tomate de la variedad Rio Grande infectadas emitían de manera diferencial ésteres de GLVs, entre los que se encontraba HB, en las interacciones de tipo virulento y avirulento (López-Gresa *et al.*, 2017). Se decidió estudiar y comparar el comportamiento estomático de las plantas infectadas con las cepas avirulenta y virulenta de *Pst* y analizar si la emisión de HB correlacionaba con esta respuesta.

Para ello, se infectaron plantas de tomate Rio Grande portadoras del gen *Pto* con las cepas avirulenta y virulenta de la bacteria *Pst*, portadoras del gen *AvrPto* o una versión delecionada de este, respectivamente. A la 1 y 4 h después de la inoculación se llevó a cabo el estudio del ratio de apertura estomática y se midió la emisión de HB en ambos tipos de interacción.

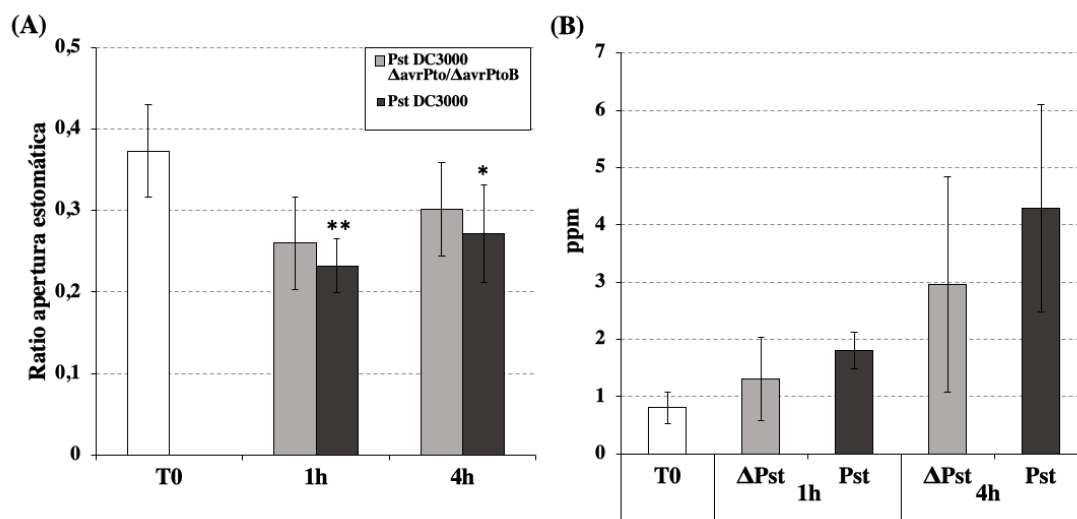


Figura 4.3: Estudio del cierre estomático (A) y emisión de butanoato de (Z)-3-hexenilo (B) en hojas de tomate Rio Grande tras infección con *Pst* (Pst) y *Pst* con deleciones en los genes *AvrPto* y *AvrPtoB* (Δ Pst). Las muestras fueron tomadas a 1 h y 4 h tras la inoculación. Las barras representan la media \pm el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) y doble asterisco (**) indica que existe una diferencia significativa de las plantas infectadas con *Pst* y aquellas infectadas con Δ Pst con un p -value < 0.05 y p -value < 0.01, respectivamente.

Tal y como se observa en la figura 4.3, el ratio de apertura estomática correlaciona con la emisión de VOCs emitidos por la planta en cada tiempo, de tal manera que cuando hay una mayor emisión de HB, los estomas de la planta están más cerrados. En particular, las plantas de tomate infectadas con la cepa avirulenta en las que tiene lugar el establecimiento de ETI y la planta resiste eficazmente la infección, presentaron un mayor cierre estomático en todos los tiempos analizados.

Este resultado junto con los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, confirman la hipótesis acerca del papel que juegan los GLVs en la defensa estomática frente a la infección bacteriana. En tomate (Du *et al.*, 2014) y *Arabidopsis* (Melotto *et al.*, 2006) se han descrito dos etapas dentro de la regulación estomática tras la infección con *Pst*. Una vez se da el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), las plantas cierran los estomas en un periodo de aproximadamente 1 h, limitando la entrada del patógeno. Este cierre estomático estaría regulado por ABA y SA. Transcurridas 4 h desde la inoculación bacteriana, tendría lugar una segunda fase en la que la coronatina bacteriana provocaría la reapertura de los estomas, en este caso regulado por JA. En este estudio hemos observado que, como consecuencia del reconocimiento de efectores bacterianos, podría establecerse una tercera fase en la que la planta volviera a cerrar los estomas en un proceso mediado por GLVs e independiente del SA. Por estos motivos, se ha propuesto un modelo análogo al modelo en zig-zag del sistema defensivo de las plantas (Jones y Dangl, 2006) pero en este caso de la defensa estomática (Figura 4.4).

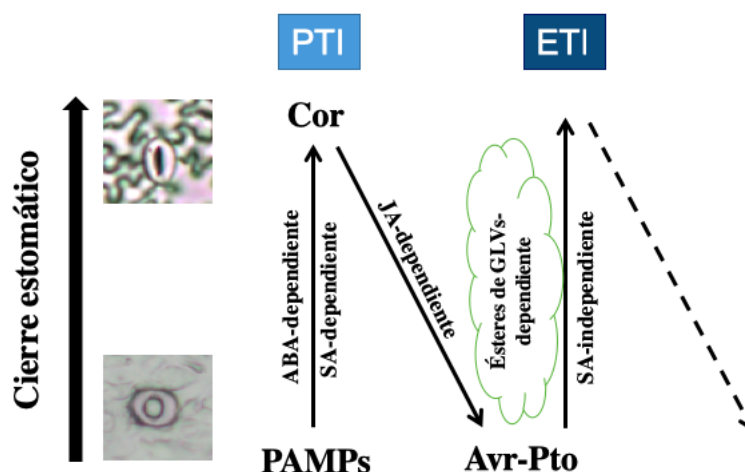


Figura 4.4: Modelo en zig-zag para la defensa estomática. De manera análoga al modelo en zig-zag previamente propuesto para el sistema defensivo de las plantas (Jones y Dangl, 2006) se pueden definir tres fases dentro en la defensa estomática. En la fase I, se produce el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y las plantas responden cerrando sus estomas a través de la respuesta defensiva mediada por ABA y SA, contribuyendo a la PTI. En la fase II, la coronatina bacteriana provoca la reapertura de los estomas dependiente de la señalización por JA e interfiriendo con la PTI. En la fase III, los efectores bacterianos son reconocidos por la planta, activando la inmunidad asociada a efectores (ETI) y la planta actúa volviendo a cerrar los estomas a través de un proceso dependiente de GLVs e independiente de SA.

4.2.4. Análisis de los cambios transcriptómicos producidos por HB en hojas de tomate

Para tener una visión global de los cambios a nivel transcriptómico de las plantas de tomate tratadas con HB respecto a plantas control, se realizó un experimento de RNA-Seq. Para ello, se realizaron tratamientos en cámaras de metacrilato y se tomó muestra de las hojas 24 h después de los tratamientos.

Para el análisis de los datos, se consideró que un gen estaba inducido cuando presentara un *fold change* ≥ 2 , y que estaba reprimido cuando este *fold change* fuera < 0.5 en las plantas tratadas respecto a las plantas control. Asimismo, se eligieron genes que presentaran diferencias significativas entre ambos tratamientos con un *p-value* < 0.05 . Se observaron un gran número de genes diferencialmente expresados entre las plantas control y las plantas tratadas, siendo mayor el número de genes inducidos. Además se llevó a cabo una validación de los genes inducidos o reprimidos y más relevantes para este estudio mediante qRT-PCR (Anexo Figura S3).

Una vez realizada la selección de los genes que cumplían los requisitos establecidos, se llevó a cabo un análisis de estos genes en la base de datos Gene Ontology (GO), utilizando el genoma de tomate como referencia.

Tabla 4.1: Resumen de los genes inducidos o reprimidos en plantas de tomate tratadas con butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB).

	Término GO	Fold Enrichment	P-value
Genes inducidos	Respuesta defensiva frente a hongos	12.07	1.24E-02
	Respuesta defensiva frente a bacterias	10.28	2.23E-03
	Respuesta defensiva frente a otros organismos	8.22	1.01E-03
	Respuesta a estímulos bióticos externos	7.86	5.08E-04
	Procesos metabólicos de quitina	7.51	3.48E-03
	Respuesta a estímulos externos	7.07	2.07E-03
	Desintoxicación	2.63	6.89E-03
Genes reprimidos	Fotosíntesis	37.62	4.15E-10
	Respuesta a estímulos lumínicos	9.30	1.05E-05
	Repuesta a radiación	8.46	2.40E-05
	Generación de precursores de metabolitos y energía	3.71	3.76E-03
	Metabolismo de hidratos de carbono	2.85	4.75E-03

Dentro de los genes inducidos por HB, los términos GO más comunes dentro de la categoría de procesos biológicos estaban relacionados con la respuesta defensiva de la planta a diferentes patógenos y a estímulos externos (Tabla 4.1). Cabe destacar la inducción de varios genes pertenecientes a la familia génica de receptores tipo quinasa con repeticiones ricas en leucina (*Leucine-Rich Repeats Receptor-Like Kinase, LRR-RLK*), entre los que resalta el gen Solyc12g036793, por ser uno de los más inducidos (Anexo Figura S3). Los LRR-RLKs son una amplia y variada familia génica involucrada principalmente en procesos de desarrollo y respuesta a estrés. Este tipo de receptores tienen un papel clave en el sistema inmune de las plantas ya que son los encargados de reconocer diferentes elicitors bacterianos, como es el receptor FLS2, involucrado en la percepción del extremo N-terminal de la flagelina bacteriana (Gómez-Gómez y Boller, 2002). Otro LRR-RLK identificado recientemente es el receptor EFR, encargado de reconocer el factor de elongación bacteriano Tu (EF-Tu) (Zipfel *et al.*, 2006). Aparte del reconocimiento de elicitors, estos RLKs participan en el reconocimiento de factores de avirulencia de patógenos (genes *Avr*) (Lee *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que HB podría actuar como ligando de este tipo de receptores implicados en la respuesta defensiva frente a patógenos y por lo tanto activar la respuesta asociada a PAMPs o la respuesta asociada a efectores conocida como ETI, reforzando así el nuevo modelo propuesto (Fig 4.4).

Dentro de los genes que presentaron una mayor inducción se encuentran los genes marcadores de defensa frente a patógenos de tipo biotrofo *PRI* (X68738) y *P23* (X70787) (Rodrigo *et al.*, 1993; Tornero *et al.*, 1993) e incluso de eliminación de sustancias tóxicas como el cadmio (Solyc06g066590), que también se ha relacionado con una mayor resistencia frente a infecciones bacterianas y fúngicas (Zhang *et al.*, 2016).

Además se identificaron diferentes factores de transcripción (TF) inducidos de manera significativa en las plantas tratadas HB pertenecientes a las familias de factores de transcripción más importantes implicados en las respuestas de las plantas frente a estreses de tipo biótico como abiótico tales como la familia MYB (Solyc03g093890; Solyc04g079360; Solyc09g090130); WRKY

(Solyc08g062490; Solyc05g015850); y por último pertenecientes a la familia NAC (Solyc04g005610; Solyc05g007770).

En lo que respecta a los genes reprimidos en plantas de tomate tratadas con HB respecto a las plantas control, cabe destacar que la mayoría de genes reprimidos estaban relacionados con la fotosíntesis y el metabolismo primario de las plantas (Tabla 4.1). Se ha descrito que el ataque por patógenos o herbívoros afecta a la maquinaria fotosintética de manera negativa mediante la supresión de diferentes elementos clave en la fotosíntesis, tanto a nivel de expresión génica como a nivel de proteína (Bilgin *et al.*, 2010; Gohre *et al.*, 2012), lo que explicaría que las plantas tratadas con HB presentaran disminución de la capacidad fotosintética.

También se identificaron varios genes reprimidos involucrados en la respuesta frente a patógenos regulados por diferentes rutas de señalización hormonales, como es el caso de genes marcadores de la señalización por JA (Solyc01g005440; Solyc03g098780) que se debería principalmente al antagonismo existente entre las hormonas SA/JA (Gimenez-Ibanez y Solano, 2013). Estos resultados coinciden con los observados previamente, en los que observamos una represión de los genes marcadores de JA, tales como *TC121* y la familia de los *JAZ* (Anexo Figura S2).

Cabe destacar la notable represión de varios genes implicados en la señalización de hormonas clave en el desarrollo y crecimiento de la planta como auxinas (Solyc01g110940) y giberelinas (Solyc04g017720), sugiriendo que tratamientos con HB podrían regular negativamente varios procesos en los que actúen estas hormonas.

Una de las consecuencias fisiológicas más importantes que se da cuando las plantas activan su sistema defensivo de manera prolongada es la inhibición del crecimiento (Gomez-Gomez *et al.*, 1999). Este fenómeno se debe principalmente a que la activación de los diferentes mecanismos defensivos conlleva un gran coste energético para las plantas, por lo que su desarrollo se ve limitado estableciéndose así un balance entre crecimiento y defensa. Este balance crecimiento-defensa está regulado en gran parte por diferentes mecanismos de *crossstalk* hormonal donde participan diferentes fitohormonas como SA, JA, auxinas y/o giberelinas (Huot *et al.*, 2014).

Las giberelinas son las fitohormonas implicadas en el crecimiento de la planta por excelencia. La producción de giberelinas desestabiliza a los represores de su respuesta, las proteínas DELLA, promoviendo el crecimiento de la planta. Se ha observado que una de las consecuencias del inicio de la respuesta defensiva es la supresión del crecimiento mediado por las giberelinas, ya que el reconocimiento de la flagelina bacteriana por el receptor FLS2 estabiliza a las proteínas DELLA, suprimiendo la acción de las giberelinas (Zentella *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008).

Por otra parte diferentes patógenos como *Ps* y *Agrobacterium tumefaciens* son capaces de sintetizar auxinas para promover el desarrollo de la enfermedad (O'Donnell *et al.*, 2013). Por su parte, las plantas responden a este mecanismo a través de la supresión de la señalización de auxinas frenando el avance de la enfermedad. Se ha demostrado que el reconocimiento de elicitores bacterianos como las proteínas R activan la señalización del SA y que esta no afecta a la síntesis de auxinas, sino que actúa estabilizando las proteínas represoras de la señalización de auxinas, las proteínas AUX/IAA, y por lo tanto disminuyendo así la señalización de estas hormonas (Wang *et al.*, 2007; Huot *et al.*, 2014).

Estos resultados parecen confirmar que el cierre estomático producido por HB se debe a la capacidad de este compuesto de activar la señalización defensiva de la planta como si se tratara de un inductor o efector bacteriano, aunque esta respuesta puede tener efectos negativos en el desarrollo normal de las plantas, afectando o disminuyendo la capacidad fotosintética y el crecimiento.

4.3. Posibles aplicaciones del butanoato de Z-3-hexenilo en agricultura

4.3.1. Papel de butanoato de (Z)-3-hexenilo frente a estrés hídrico

Una vez confirmado el papel de HB como inductor de resistencia frente a estrés biótico por su capacidad de cerrar estomas se planteó la posibilidad de que este compuesto resultara útil para hacer frente a otro tipo de estreses en los que la regulación estomática tuviera un papel clave, como es el caso de la sequía.

Para ello, plantas de tomate fueron sometidas a periodos de sequía de 3 y 6 días de duración, coincidiendo con la sintomatología suave y severa, y tratadas con HB con una periodicidad de 2 días, para asegurar que el compuesto actuara de manera eficaz. Tras cada uno de los periodos de estrés hídrico se evaluaron diferentes parámetros como el peso, la fuga de electrolitos o el ratio de apertura estomática en plantas control y tratadas con HB.

El primer aspecto a tener en cuenta fue estudiar el cierre estomático en condiciones de estrés hídrico, tanto en las plantas tratadas con HB como en las plantas control. Como se muestra en la figura 4.5A, a los 3 días las plantas que habían sido tratadas con HB, en ausencia o presencia de riego, presentaron un mayor ratio de cierre estomático que las plantas control no tratadas. Merece la pena destacar que la apertura estomática de las plantas no tratadas con HB en condiciones de sequía resultó ser similar a la de las plantas tratadas con HB que habían sido regadas de manera regular. Estos resultados indicarían que el efecto de los tratamientos con HB sobre el cierre estomático es comparable con el cierre estomático natural producido por un estrés hídrico.

Por otra parte, se observa que las plantas tratadas con HB presentan un mayor cierre estomático cuando son sometidas a estrés hídrico, indicando que las plantas tratadas con HB tiene un mayor potencial de cierre estomático también en condiciones de sequía. Asimismo, a los 6 días se observa que los ratios de apertura estomática mantuvieron la tendencia en las plantas control regadas y en las plantas tratadas con HB regadas o no, mientras que en el caso las plantas que habían sido sometidas a sequía y no se habían tratado con HB ni se pudieron obtener moldes de la hoja debido al mal estado que presentaban las plantas.

Otro factor a tener en cuenta es la pérdida de agua de la planta tras estar sometida a estrés hídrico (Aroca, 2012), parámetro que evaluamos a través del peso de la planta. Tras 6 días de ausencia de riego no se observaron diferencias significativas entre el peso de las plantas tratadas con HB sometidas o no a estrés hídrico (Figura 4.5B). Sin embargo, aquellas plantas no tratadas sometidas a sequía mostraron una reducción de casi la mitad del peso con respecto a las que no estaban bajo ningún tipo de estrés. Estos datos correlacionaban con los observados en la figura 4.5A, lo que indicaría que un mayor cierre estomático inducido por HB evitaría una mayor pérdida de agua por

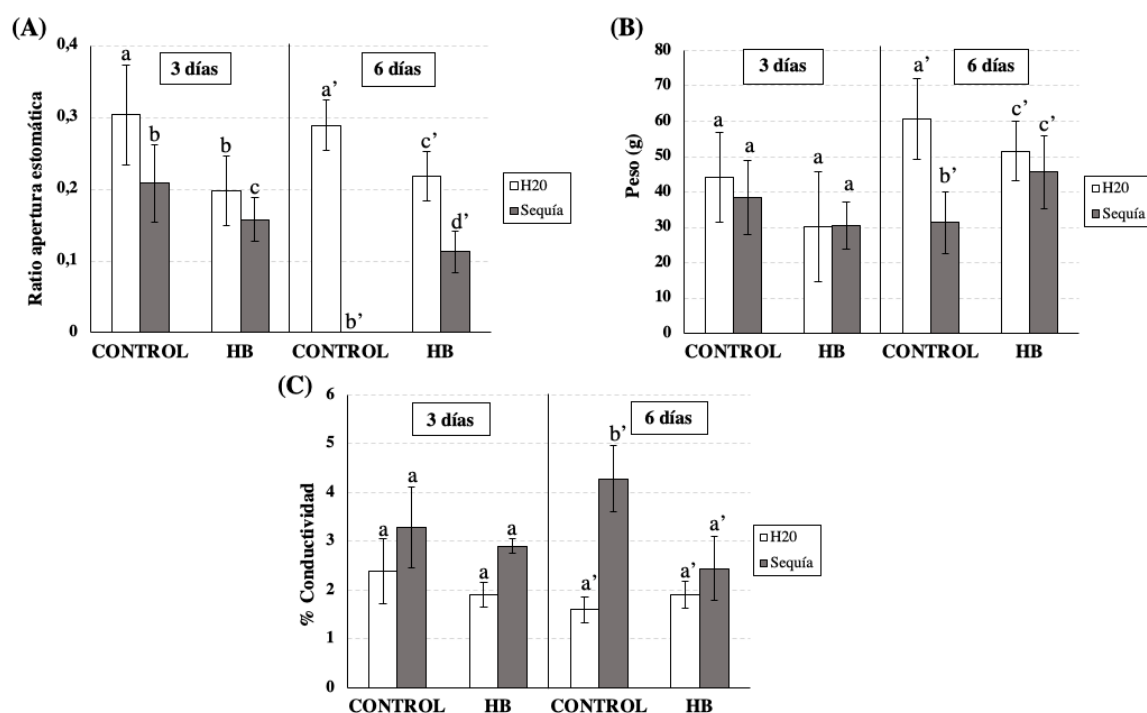


Figura 4.5: Efecto del butanoato de (Z)-3-hexenilo en plantas de tomate Flora-Dade sometidas a estrés hídrico. (A) Ratio de apertura estomática, (B) peso y (C) fuga de electrolitos de plantas de tomate tratadas (HB) o no (CONTROL) y sometidas (Sequía) o no (H_2O) a estrés hídrico. Se llevó a cabo el análisis de todos los parámetros tras 3 y 6 días después de establecer las condiciones de estrés. Las barras representan la media \pm el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizó un test ANOVA, las letras diferentes indican diferencias significativas con un p -value < 0.05 entre las diferentes muestras.

parte de la planta.

Por último, se realizó la medida de la conductividad de las muestras para analizar la fuga de electrolitos, fenómeno que permite estudiar posibles alteraciones en la estructura y permeabilidad de las membranas celulares (Martin *et al.*, 1987). Como se aprecia en la figura 4.5C, las plantas que no habían sido tratadas con HB y sometidas a estrés presentaban un alto porcentaje de conductividad, confirmando así el daño ocasionado a las plantas bajo estrés hídrico, mientras que las plantas tratadas con HB sometidas o no a sequía mostraban una conductividad similar a las plantas que habían sido regadas. Estos resultados parecen indicar que HB también podría tener un papel en la protección y estabilización de las membranas celulares.

Una vez confirmado que las plantas tratadas con HB presentaban mayor tolerancia a estrés hídrico, se quiso estudiar a qué fenómenos podría deberse. Para ello, se llevó a cabo un análisis de la expresión génica de genes marcadores de estrés hídrico tales como *LEA* (Hong-Bo *et al.*, 2005) y de genes marcadores de la fitohormona que tiene un papel clave en estrés hídrico, el ABA, tales como *RAB18* y *P5CS1* (Gonzalez-Guzman *et al.*, 2014).

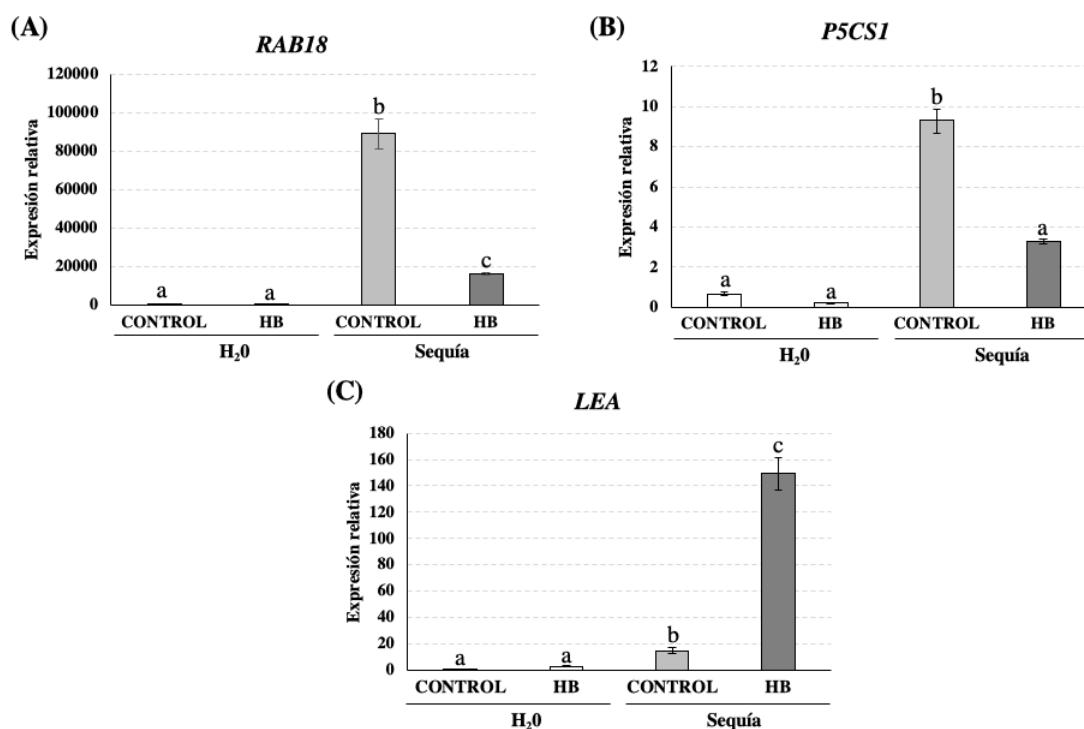


Figura 4.6: Expresión de los genes *RAB18*, *P5CS1* y *LEA* en plantas de tomate Flora-Dada tratadas (HB) o no (CONTROL) con butanoato de (Z)-3-hexenilo, sometidas (Sequía) o no (H_2O) a estrés hídrico. (A) Niveles de expresión de *RAB18*, (B) *P5CS1* y (C) *LEA* en hojas de tomate tras ser sometidas a un periodo de sequía de 6 días. Los tratamientos con HB se realizaron cada dos días. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen *actina*. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. Se realizó un test ANOVA y las letras diferentes indican diferencias significativas con un p -value < 0.05 entre las diferentes muestras.

Se observó que los genes marcadores de ABA, *RAB18* y *P5CS1*, estaban inducidos de manera significativa en las plantas sometidas a sequía, aunque en ambos casos las plantas tratadas con HB presentaban una inducción mucho menor (Figuras 4.6A,B). Por el contrario, las plantas sometidas a sequía y tratadas con HB presentaban una mayor inducción de *LEA* que las plantas no tratadas (Figura 4.6C).

Estos resultados parecen indicar que la mayor resistencia frente a sequía en plantas tratadas con HB se debe principalmente a la inducción de genes de síntesis de proteínas LEA, encargadas de proteger a las plantas frente a diferentes estreses abióticos por su capacidad antioxidante o estabilización de la membrana (Hong-Bo *et al.*, 2005), y además de una manera independiente de ABA, tal y como se demostró en experimentos anteriores (Figura S1). Hay evidencias de que la respuesta a sequía puede estar regulada de manera dependiente o independiente de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). En la señalización por sequía independiente de ABA, participarían diferentes genes que codifican para proteínas reguladoras o activadores tempranos de la respuesta transcripcional, incluyendo factores de transcripción de las familias DREB, NAC, WRKY o MYB (Agarwal y Jha, 2010; Liu *et al.*, 2018).

Se ha demostrado la emisión de diferentes GLVs como (*Z*)-3-hexenal, (*Z*)-3-hexenol y (*E*)-2-hexenol en respuesta a estrés hídrico y salino (Capitani *et al.*, 2009) confirmando el papel de los GLVs en respuesta frente a estrés abiótico. Además se ha observado que plantas de la especie *Vicia faba* son capaces de percibir VOCs como el hexenal emitidos por plantas vecinas que se encuentran sometidas a estrés salino, protegiéndolas así de posibles futuros estreses (Caparrotta *et al.*, 2018).

4.3.2. Estudio de la duración del efecto y la eficacia de HB en diferentes especies vegetales

Para estudiar con más detalle las diferentes aplicaciones que podría tener este compuesto en la agricultura, se estudió tanto la duración del efecto como el punto de eficacia máxima de HB. Para ello plantas de tomate fueron tratadas mediante pulverización con este compuesto y se analizó el ratio de apertura estomática a las 6, 10, 24, 48 72 horas después del tratamiento, así como a los 7 y 10 días post-tratamiento.

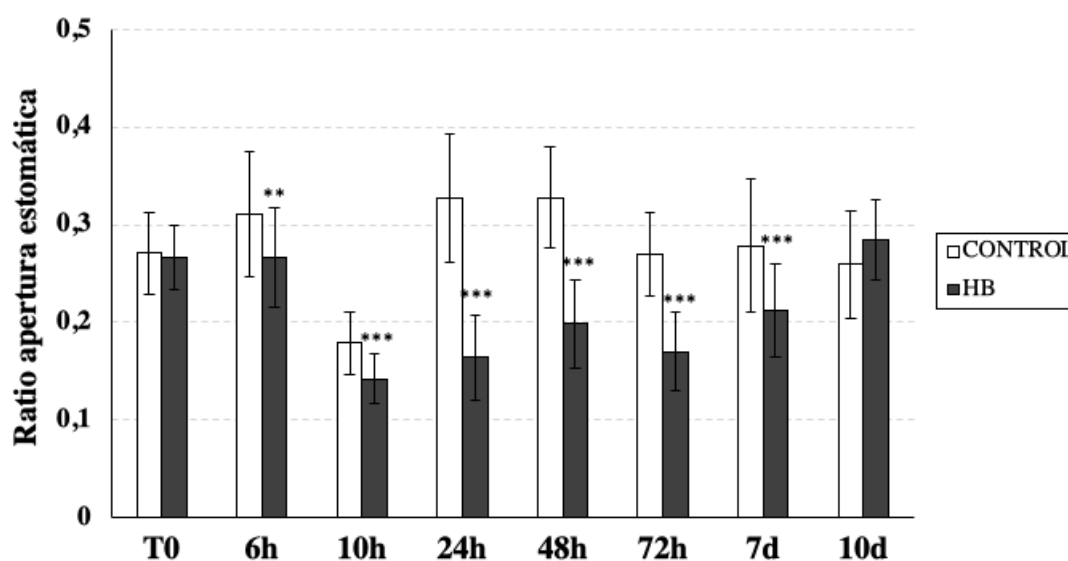


Figura 4.7: Duración del efecto de HB en plantas de tomate. Se midió el ratio de apertura estomática en plantas control (CONTROL) y tratadas con HB (HB) a 0 (T0), 6, 10, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento (h) y a 7 y 10 días (d) después de los tratamientos. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los ratios corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 50 estomas correspondientes a 3 plantas independientes de un experimento representativo. El doble (**) y triple asterisco (***) indican que existe una significación estadística con un *p-value* < 0.01 y un *p-value* < 0.001 entre las plantas control y las plantas tratadas.

Como muestra la figura 4.7, a las 6 horas el compuesto HB ya produce el cierre estomático de manera significativa, alcanzando un máximo de eficacia a las 24 h después del tratamiento, disminuyendo hasta casi a la mitad el ratio de apertura estomática respecto a las plantas control. El efecto de este GLV permaneció hasta 10 días después del tratamiento, donde ya no se observaron diferencias significativas entre las plantas tratadas y las plantas control. La disminución en

el cierre estomático observada a las 10 horas en las plantas sin tratar y tratadas con HB se debe principalmente al fotoperiodo.

Una vez se ha demostrado que HB es un VOC defensivo que induce el cierre estomático en plantas de tomate, y que su mayor efecto se observa a las 24 h, se evaluó si este compuesto era capaz de actuar en diferentes especies vegetales de interés agronómico. Para ello plantas de diferentes especies como *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Zea mays*, *Citrus x jambhiri* y plantas de tomate utilizadas como control positivo, fueron tratadas con HB mediante pulverización, y se midió el ratio de apertura estomática 24 y 48 h post-tratamiento (Figura 4.8). Los tratamientos con este éster de GLV produjeron el cierre estomático de manera significativa en todas las especies analizadas, indicando que HB podría ser un inductor del cierre estomático universal actuando en diferentes especies vegetales pertenecientes a las familias Solanaceae, Brassicaceae, Fabaceae, Poaceae y Rutaceae.

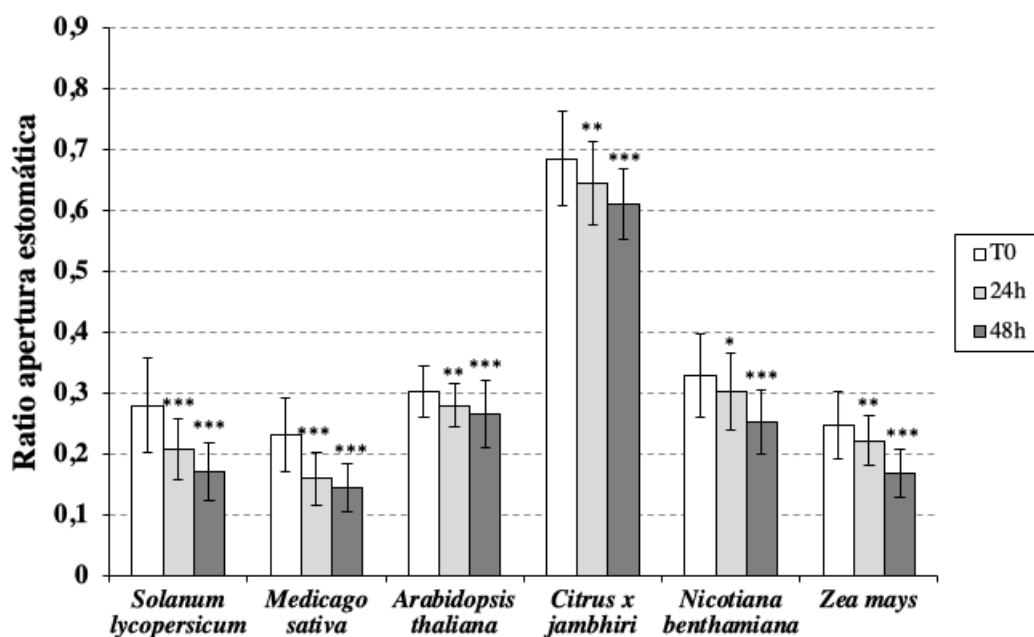


Figura 4.8: Efecto de HB en diferentes especies vegetales. El ratio de apertura estomática fue analizado en las diferentes especies a 0 (T0), 24 y 48 horas post-tratamiento. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los ratios corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 50 estomas correspondientes a 3 plantas independientes de un experimento representativo. El simple (*) doble (**) y triple asterisco (***) indican que existe una significación estadística con un p -value < 0.01 , p -value < 0.01 y p -value < 0.001 , respectivamente.

Se ha observado que HB es capaz de actuar no solo como compuesto defensivo frente a patógenos limitando su entrada, sino que también podría aumentar la resistencia de las plantas frente a estreses de tipo abiótico como es el caso de la sequía. Sin embargo, los estomas regulan procesos clave para la planta como la toma de CO_2 durante la fotosíntesis o la pérdida de agua en la transpiración, por lo que periodos prolongados de cierre estomático podrían ocasionar graves daños fisiológicos a las plantas, limitando su asimilación fotosintética y crecimiento (Lawson y Blatt, 2014). Por estos motivos, se propone que la aplicación de HB se lleve a cabo en momentos

puntuales de posible ataque por patógenos o estrés hídrico, evitando de esta forma ocasionar algún tipo de daño a las plantas.

4.4. Perspectivas futuras

En este Trabajo Fin de Máster se ha confirmado la importancia de los GLVs en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos, concretamente del HB. Se ha observado que el aumento de resistencia frente a la infección bacteriana con *Pst* DC3000 se debe principalmente a la capacidad de inducir el cierre estomático, de una manera independiente de SA, además de inducir la activación de diferentes genes defensivos, aunque en menor medida. A nivel transcriptómico, se ha observado que tratamientos exógenos con este compuesto activan diferentes vías de transducción de la respuesta defensiva en plantas, aunque, como consecuencia del *tradeoff* defensa/crecimiento, también afecta a la capacidad fotosintética y desarrollo de éstas. Finalmente, se ha visto que este compuesto también es capaz de aumentar la resistencia de plantas de tomate frente a otro tipo de estrés en el que la regulación estomática tiene un papel clave, como es la sequía, y que podría actuar como un compuesto inductor de cierre estomático universal, ya que es capaz de actuar en diferentes especies vegetales.

Recientemente, la “comunicación” química entre plantas ha recibido una gran atención, debido a la capacidad de los VOCs de actuar como posibles inductores de defensas en plantas vecinas o receptoras. Este sistema de alerta entre plantas se ha descrito frente al ataque por herbívoros de manera natural, como es el caso del metil jasmonato que es capaz de inducir la síntesis de inhibidores de proteasas en plantas vecinas haciendo a las plantas resistentes frente al posible ataque de estos enemigos (Farmer y Ryan, 1990); o el caso de plantas transgénicas que sobreexpresan la enzima β -ocimeno sintasa, capaces de emitir una mayor cantidad de este monoterpeno e inducir resistencia a herbívoros en plantas vecinas de maíz, judías de Lima y tomate (Muroi *et al.*, 2011; Cascone *et al.*, 2015). También hay varios ejemplos en lo referente al ataque frente a patógenos. Se ha descrito que los VOCs emitidos por plantas tratadas con BTH pueden inducir la resistencia de judías de Lima a bacteria (Yi *et al.*, 2009). Recientemente, se ha descrito que los VOCs emitidos por variedades resistentes de uva protegen frente a mildiu a tejidos receptores de dichos volátiles (Lazazzara *et al.*, 2018).

Por estos motivos y una vez estudiado el modo de acción del HB, se podrían generar plantas transgénicas mediante ingeniería metabólica que emitan de manera constitutiva este compuesto y otros GLVs que han demostrado tener también un papel defensivo (plantas *eVOCs*, *emitting VOCs*) (López-Gresa *et al.*, 2018). Además, también debería analizarse el efecto de estas plantas *eVOCs* sobre sus plantas vecinas (*rVOCs*, *receiving VOCs*), evaluando el posible papel protector de plantas *eVOCs* y por lo tanto su capacidad de inducir a plantas vecinas mayor resistencia frente a estreses tanto de tipo biótico como abiótico, y entre diferentes especies vegetales.

Por otra parte, HB parece no actuar a través de las rutas clásicas de señalización, por lo que resultaría de gran interés estudiar su cascada de transducción de señal mediante la generación de plantas transgénicas con niveles alterados de los genes regulados por HB, que ya han sido identificados mediante la tecnología RNA-Seq.

En lo que respecta al uso del HB en agricultura, en este trabajo se ha estudiado su punto máximo de eficacia, así como la duración de su efecto. Para su futura aplicación en el sector agrícola, deberían abordarse diferentes aspectos, como la determinación de la dosis mínima y máxima en las diferentes especies testadas, o confirmar mediante ensayos de campo los resultados obtenidos previamente en el invernadero. Además, otra opción muy interesante podría ser determinar los

usos concretos del HB. Entre ellos, algunos ejemplos podrían ser la evaluación de la eficacia de HB en lechuga frente a *Bremia*, cuyo micelio penetra en las plantas a través de los estomas de las hojas, de manera similar a *Ps*; o la tolerancia a sequía en Clementina Clemenules. Por último, debido al observado efecto de HB en el retraso del crecimiento, se podría evaluar la capacidad de este compuesto para producir un retraso en la maduración de la uva (*Vitis vinifera*) y que resultaría de gran interés para los productores, puesto que les permitiría controlar el periodo de la cosecha.

5

Conclusiones

- I . El papel de HB como inductor de resistencia frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 se debe principalmente a su efecto sobre el cierre estomático y, además, de una manera independiente del ácido salicílico (SA).
- II . El análisis transcriptómico mediante RNA-Seq reveló que tratamientos con HB inducen la activación de un gran número de genes implicados en la respuesta defensiva frente a patógenos y a estímulos externos. Además, se observó que este compuesto podría afectar a la capacidad fotosintética y desarrollo normal de la planta, como resultado del balance entre crecimiento y defensa.
- III . Tratamientos periódicos con HB son capaces de aumentar la resistencia frente a estreses de tipo abiótico como la sequía, hecho que podría deberse a su papel como inductor de cierre estomático, además de a la inducción de genes *LEA*.
- IV . Este éster de (Z)-3-hexenol es capaz de inducir el cierre estomático en plantas de tomate a las 6 h, alcanzando su máximo de eficacia a las 24 h y permaneciendo su efecto hasta 10 días después de los tratamientos. Además, este compuesto es capaz de actuar en un gran espectro de especies vegetales como *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Zea mays* y *Citrus x jambhiri*, presentándose como un inductor de cierre estomático universal con potencial uso en agricultura.

6

Bibliografía

- Abramovitch, R. and Martin, G. (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), pp.356-364.
- Agarwal, P. and Jha, B. (2010). Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum*, 54(2), pp.201-212.
- Ameye, M., Allmann, S., Verwaeren, J., Smagghe, G., Haesaert, G., Schuurink, R. and Audenaert, K. (2017). Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis. *New Phytologist*, 220(3), pp.666-683.
- Arnaud, D. and Hwang, I. (2015). A Sophisticated Network of Signaling Pathways Regulates Stomatal Defenses to Bacterial Pathogens. *Molecular Plant*, 8(4), pp.566-581.
- Aroca, R. (2012). *Plant Responses to Drought Stress*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bilgin, D., Zavala, J., ZHU, J., Clough, S., Ort, D. and DeLucia, E. (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell Environment*, 33(10), pp.1597-1613.
- Boller, T. and 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), pp.379-406.
- Brading, P.A., Hammond-Kosack, K.E., Parr, A., and Jones, J.D. (2000). Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant J* 23(3), 305-318.
- Bull, C. T. et al. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007. *J. Plant Pathol.* 92, 551–592 (2010).
- Caparrotta, S., Boni, S., Taiti, C., Palm, E., Mancuso, S. and Pandolfi, C. (2018). Induction of priming by salt stress in neighboring plants. *Environmental and Experimental Botany*, 147, pp.261-270.
- Capitani, D., Brilli, F., Mannina, L., Proietti, N. and Loreto, F. (2009). In Situ Investigation of Leaf Water Status by Portable Unilateral Nuclear Magnetic Resonance. *PLANT PHYSIOLOGY*, 149(4), pp.1638-164.
- Cascone, P., Iodice, L., Maffei, M., Bossi, S., Arimura, G. and Guerrieri, E. (2015). Tobacco overexpressing β -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, 173, pp.28-32.
- Corwin, J. and Kliebenstein, D. (2017). Quantitative Resistance: More Than Just Perception of a Pathogen. *The Plant Cell*, 29(4), pp.655-665.
- Cui, H., Tsuda, K. and Parker, J. (2015). Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), pp.487-511.
- D'Auria, J., Pichersky, E., Schaub, A., Hansel, A. and Gershenzon, J. (2006). Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 49(2), pp.194-207.
- Du, M., Zhai, Q., Deng, L., Li, S., Li, H., Yan, L., Huang, Z., Wang, B., Jiang, H., Huang, T., Li, C., Wei, J., Kang, L., Li, J. and Li, C. (2014). Closely Related NAC Transcription Factors of Tomato Differentially Regulate Stomatal Closure and Reopening during Pathogen Attack. *The Plant Cell*, 26(7), pp.3167-3184.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. and Orlova, I. (2006). Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(5), pp.417-440.
- Duradeva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. and Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1), pp.16-32.
- Farmer, E. and Ryan, C. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), pp.7713-7716.
- Flor, H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), pp.275-296.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), pp.205-227.
- Gimenez-Ibanez, S. and Solano, R. (2013). Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 4.

- Gimenez-Ibanez, S., Boter, M., Ortigosa, A., Garcia-Casado, G., Chini, A., Lewsey, M.G., et al. (2017). JAZ2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytol*, 213(3), 1378-1392.
- Göhre, V., Jones, A., Sklenář, J., Robatzek, S. and Weber, A. (2012). Molecular Crosstalk Between PAMP-Triggered Immunity and Photosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(8), pp.1083-1092.
- Gómez-Gómez, L. and Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, 7(6), pp.251-256.
- Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* 5, 1003-1011.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G. and Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 18(3), pp.277-284.
- González-Guzmán, M., Rodríguez, L., Lorenzo-Orts, L., Pons, C., Sarrion-Perdigones, A., Fernández, M.A. (2014). Tomato PYR/PYL/R-CAR abscisic acid receptors show high expression in root, differential sensitivity to the abscisic acid agonist quinabactin, and the capability to enhance plant drought resistance. *J Exp Bot* 65(15), 4451-4464.
- Gonzalez-Mas, M.C., Rambla, J.L., Alamar, M.C., Gutierrez, A., and Granell, A. (2011). Comparative analysis of the volatile fraction of fruit juice from different Citrus species. *PLoS One* 6(7), e22016.
- Grimmer, M.K., John Foulkes, M., and Paveley, N.D. (2012). Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. *J Exp Bot* 63(12), 4321-4331.
- Heil, M. (2014). Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. *New Phytologist*, 204(2), pp.297-306.
- Hong-Bo, S., Zong-Suo, L. and Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45(3-4), pp.131-135.
- Huang, D., Wu, W., Abrams, S. and Cutler, A. (2008). The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), pp.2991-3007.
- Huang, J., Cardoza, Y., Schmelz, E., Raina, R., Engelberth, J. and Tumlinson, J. (2003). Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta*, 217(5), pp.767-775.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. and He, S. (2014). Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Molecular Plant*, 7(8), pp.1267-1287.
- Ishiga, Y., Ishiga, T., Uppalapati, S.R., and 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. and Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), pp.323-329.
- Kachroo, A. and Robin, G. (2013). Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4), pp.527-533.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., and Takabayashi, J. (2008). Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in *Arabidopsis* against *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 69(11), 2127-2132.
- Kliebenstein, D. (2012). Plant Defense Compounds: Systems Approaches to Metabolic Analysis. *Annual Review of Phytopathology*, 50(1), pp.155-173.
- Lawson, T. and Blatt, M. (2014). Stomatal Size, Speed, and Responsiveness Impact on Photosynthesis and Water Use Efficiency. *PLANT PHYSIOLOGY*, 164(4), pp.1556-1570.
- Lazazzara, V., Bueschl, C., Parich, A., Pertot, I., Schuhmacher, R. and Perazzolli, M. (2018). Downy mildew symptoms on grapevines can be reduced by volatile organic compounds of resistant genotypes. *Scientific Reports*, 8(1).
- Lee, S., Han, S., Bartley, L. and Ronald, P. (2006). Unique characteristics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* AvrXa21 and implications for plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), pp.18395-18400.
- Lim, C.W., Luan, S., and Lee, S.C. (2014). A prominent role for RCAR3- mediated ABA signaling in response to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 infection in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 55:1691– 1703.
- Lin, N.C., and Martin, G.B. (2005). An avrPto/avrPtoB mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 does not elicit Pto-mediated resistance and is less virulent on tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(1), 43-51.

-
- Lison, P., Lopez-Gresa, M.P., Rodrigo, I., and Belles, J.M. (2017). National Patent. Compuesto para la proteccion de plantas mediante cierre estomatico, uso, composicion y metodo relacionados. P201730685. Spain patent application.
- Lison, P., Rodrigo, I., and Conejero, V. (2006). A novel function for the cathepsin D inhibitor in tomato. *Plant Physiol* 142(3), 1329-1339.
- Liu, S., Lv, Z., Liu, Y., Li, L. and Zhang, L. (2018). Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics and Molecular Biology*, 41(3), pp.624-637.
- López-Gresa, M., Lisón, P., Campos, L., Rodrigo, I., Rambla, J., Granell, A., Conejero, V. and Bellés, J. (2017). A Non-targeted Metabolomics Approach Unravels the VOCs Associated with the Tomato Immune Response against *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- López-Gresa, M., Payá, C., Ozáez, M., Rodrigo, I., Conejero, V., Klee, H., Bellés, J. and Lisón, P. (2018). A New Role For Green Leaf Volatile Esters in Tomato Stomatal Defense Against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Martin, U., Pallardy, S. and Bahari, Z. (1987). Dehydration tolerance of leaf tissues of six woody angiosperm species. *Physiologia Plantarum*, 69(1), pp.182-186.
- Matsui, K., Minami, A., Hornung, E., Shibata, H., Kishimoto, K., Ahnert, V., Kindl, H., Kajiwara, T. and Feussner, I. (2006). Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry*, 67(7), pp.649-657.
- Melotto, M., Underwood, W. and He, S. (2008). Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), pp.101-122.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. and He, S. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell*, 126(5), pp.969-980.
- Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. and He, S. (2017). Stomatal Defense a Decade Later. *Plant Physiology*, 174(2), pp.561-571.
- Montillet, J.L., Leonhardt, N., Mondy, S., Tranchimand, S., Rumeau, D., Boudsocq, M., et al. (2013). An abscisic acid-independent oxylipin pathway controls stomatal closure and immune defense in Arabidopsis. *PLoS Biol* 11(3), e1001513.
- Murata, Y., Mori, I.C., and Munemasa, S. (2015). Diverse stomatal signaling and the signal integration mechanism. *Annu Rev Plant Biol* 66, 369-392.
- Muroi, A., Ramadan, A., Nishihara, M., Yamamoto, M., Ozawa, R., Takabayashi, J. and Arimura, G. (2011). The Composite Effect of Transgenic Plant Volatiles for Acquired Immunity to Herbivory Caused by Inter-Plant Communications. *PLoS ONE*, 6(10), p.e24594.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N. and Jones, J. (2008). DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Current Biology*, 18(9), pp.650-655.
- Niinemets, U., Kannaste, A. and Copolovici, L. (2013). Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Ntoukakis, V., Mucyn, T.S., Gimenez-Ibanez, S., Chapman, H.C., Gutierrez, J.R., Balmuth, A.L., et al. (2009). Host inhibition of a bacterial virulence effector triggers immunity to infection. *Science* 324(5928), 784-787.
- O'Donnell, P., Schmelz, E., Moussatche, P., Lund, S., Jones, J. and Klee, H. (2003). Susceptible to intolerance - a range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. *The Plant Journal*, 33(2), pp.245-257.
- Panchal, S., and Melotto, M. (2017). Stomate-based defense and environmental cues. *Plant Signal Behav* 12(9).
- Payá Montes, C., 2017. Estudio del papel defensivo y del mecanismo de accion de los esteres del (Z)-3-hexenol en plantas de tomate frente a *Pseudomonas syringae*. Trabajo Final de Grado. Universitat Politecnica de Valencia. 57 pp.
- Pichersky, E., Noel, J. and Duradeva, N. (2006). Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Science*, 311(5762), pp.808-811.
- Pieterse, C., Van Wees, S., Van Pelt, J., Knoester M, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. and Van Loon, L. (1998). A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 10(9), pp.1571-1580.
- Rodrigo, I., Vera, P., Tornero, P., Hernandez-Yago, J., and Conejero, V. (1993). cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23. Characterization as a vacuolar antifungal factor. *Plant Physiol* 102(3), 939-945.
-

- Ronald, P., Salmeron, J., Carland, F. and Staskawicz, B. (1992). The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *Journal of Bacteriology*, 174(5), pp.1604-1611.
- Scala, A., Mirabella, R., Mugo, C., Matsui, K., Haring, M. and Schuurink, R. (2013). (E)-2-hexenal promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* by activating jasmonic acid pathways in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F., and Metraux, J.P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Song, G. and Ryu, C. (2013). Two Volatile Organic Compounds Trigger Plant Self-Defense against a Bacterial Pathogen and a Sucking Insect in Cucumber under Open Field Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), pp.9803-9819.
- Spinelli, F., Noferini, M., Vanneste, J. and Costa, G. (2010). Potential of the electronic-nose for the diagnosis of bacterial and fungal diseases in fruit trees. *EPPO Bulletin*, 40(1), pp.59-67.
- Spoel, S. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *THE PLANT CELL ONLINE*, 15(3), pp.760-770.
- Toome, M., Randjarv, P., Copolovici, L., Niinemets, U., Heinsoo, K., Luik, A. and Noe, S. (2010). Leaf rust induced volatile organic compounds signalling in willow during the infection. *Planta*, 232(1), pp.235-243.
- Tornero, P., Rodrigo, I., Conejero, V., and Vera, P. (1993). Nucleotide sequence of a cDNA encoding a pathogenesis-related protein, P1-p14, from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiol* 102(1), 325.
- ul Hassan, M., Zainal, Z. and Ismail, I. (2015). Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, 13(6), pp.727-739.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R., Pandey, M. and Sharma, S. (2017). Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science*, 08.
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A. and Dong, X. (2007). Salicylic Acid Inhibits Pathogen Growth in Plants through Repression of the Auxin Signaling Pathway. *Current Biology*, 17(20), pp.1784-1790.
- Whalen, M., Innes, R., Bent, A. and Staskawicz, B. (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* Pathogens of *Arabidopsis* and a Bacterial Locus Determining Avirulence on Both *Arabidopsis* and Soybean. *THE PLANT CELL ONLINE*, 3(1), pp.49-59.
- Xin, X. and He, S. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), pp.473-498.
- Xin, X., Kvitko, B. and He, S. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), pp.316-328.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*, 10(2), pp.88-94.
- Yi, H., Heil, M., Adame-Alvarez, R., Ballhorn, D. and Ryu, C. (2009). Airborne Induction and Priming of Plant Defenses against a Bacterial Pathogen. *Plant Physiology*, 151(4), pp.2152-2161.
- Zeng, W., and He, S.Y. (2010). A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 153:1188-1198.
- Zentella, R., Zhang, Z., Park, M., Thomas, S., Endo, A., Murase, K., Fleet, C., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y. and Sun, T. (2007). Global Analysis of DELLA Direct Targets in Early Gibberellin Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(10), pp.3037-3057.
- Zhang, M., Mo, H., Sun, W., Guo, Y. and Li, J. (2016). Systematic Isolation and Characterization of Cadmium Tolerant Genes in Tobacco: A cDNA Library Construction and Screening Approach. *PLOS ONE*, 11(8), p.e0161147.
- Zheng, X.Y., Spivey, N.W., Zeng, W., Liu, P.P., Fu, Z.Q., Klessig, D.F., et al. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* 11(6), 587-596.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J., Boller, T. and Felix, G. (2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell*, 125(4), pp.749-760.

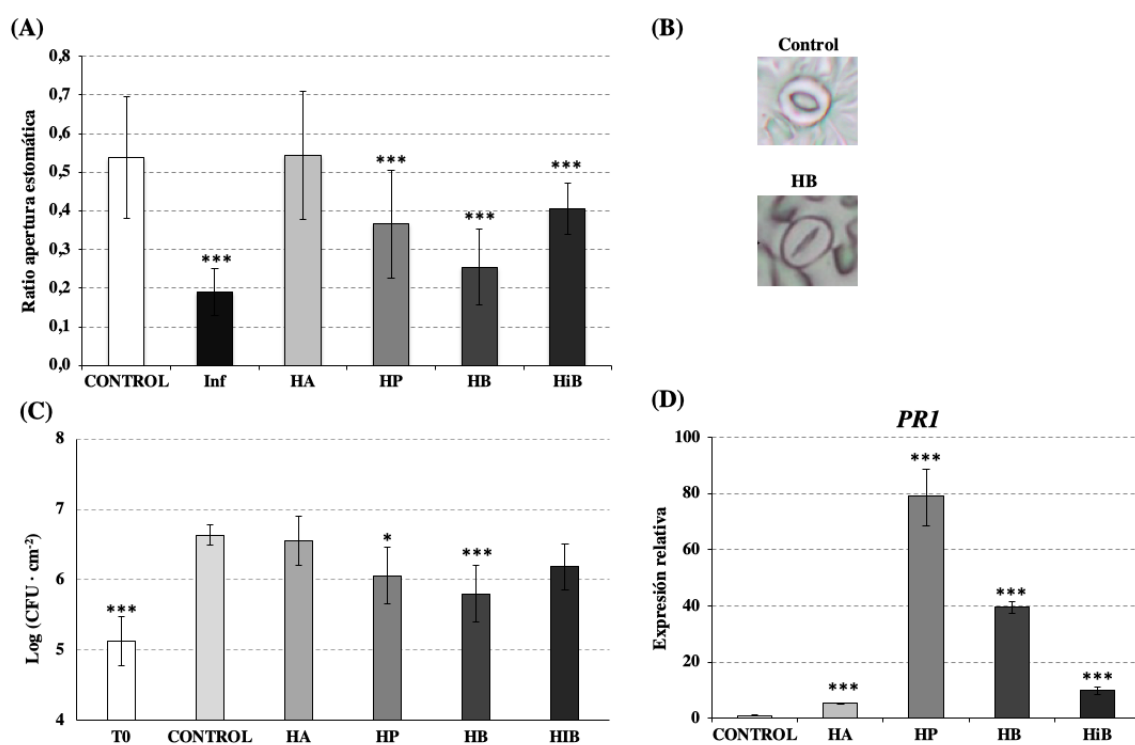


Figura S1: Estudio del papel defensivo de diferentes ésteres de (Z)-3-hexenol en plantas de tomate Flora-Dade. (A) Ratio de apertura estomática de hojas de tomate tratadas con de (Z)-3-hexenilo (HA), propanoato de (Z)-3-hexenilo (HP), butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB), isobutanoato de (Z)-3-hexenilo (HiB), agua (CONTROL) y plantas infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Inf). (B) Imagen representativa de estomas de una planta control y una planta tratada con HB, respectivamente. (C) Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en hojas de plantas de tomate Flora-Dade control y de plantas Flora-Dade pre-tratadas con HA, HP, HB y HiB 24h post-infección. (D) Niveles de expresión del gen *PRI* en plantas tratadas con los diferentes ésteres. En todos los casos las muestras se cogieron 24 h después de los tratamientos con cada uno de los compuestos. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Cada barra corresponde a la media \pm el error estándar de tres plantas de un experimento representativo. El asterisco (*) y triple asterisco (***) indican que existe una significación estadística con un p -value < 0.05 y p -value < 0.001 respectivamente, entre las plantas control y las plantas tratadas (Payá, 2017; López-Gresa et al., 2018.)

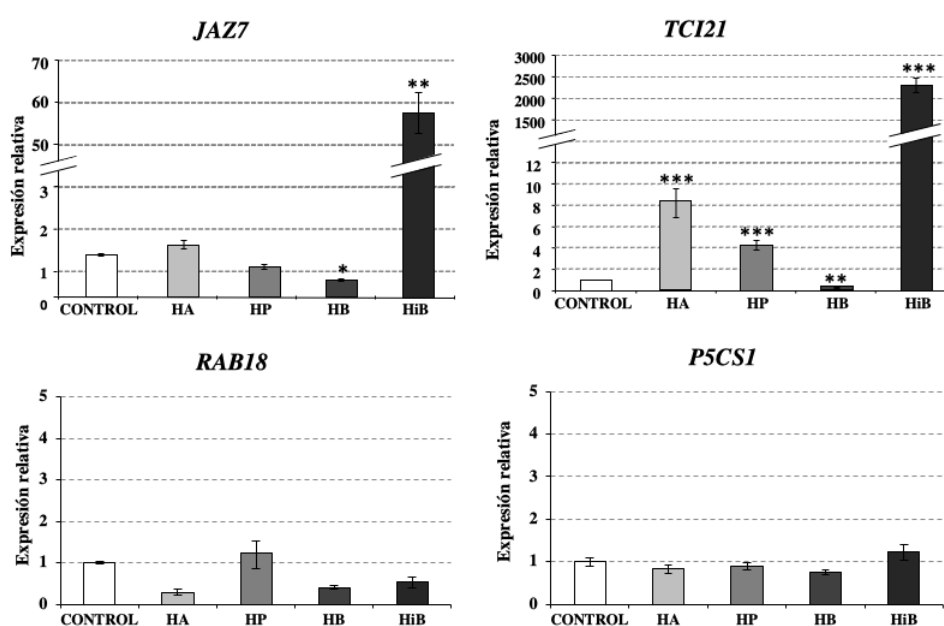


Figura S2 : Niveles de expresión de los genes *JAZ7*, *TCI21*, *RAB18* y *P5CS1* en plantas de tomate control y plantas tratadas 24 horas después de tratamientos con acetato (HA), propanoato (HP), isobutanoato (HiB) o butanoato (HB) de (Z)-3-hexenilo. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen *actina*. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un *t-test*. El asterisco (*), doble asterisco (**) y triple asterisco (***) indican que hay diferencias significativas con un *p-value* < 0.05, *p-value* < 0.01 y *p-value* < 0.001 entre las plantas control y las plantas tratadas, respectivamente.

Tabla S1.: Secuencia de los oligonucleótidos empleados en los experimentos de PCR cuantitativa.

Gen	Primer directo	Primer reverso
<i>RAB18</i>	5' CCTGGGATGCATTGAACACC 3'	5' CACGGGACACCATAACACAC 3'
<i>P5CSI</i>	5' ACCTTAATCTGGAGGCTTGA 3'	5' AATTATTTACCCACCTGCC 3'
<i>LEA</i>	5' TTCCCTGCTGACAAAGCTAGAGCA 3'	5' AGGGTGCAGATGAAACTGATCCGA 3'
<i>JAZ7</i>	5' TTGCTATGGCTCGTAGAGCAACTC 3'	5' TTTGCCAATGAACGCTTGACGACG 3'
<i>TCI21</i>	5' ACTCGTCCTGTGCTTTGTCC 3'	5' CCCAAGAGGATTTTCGTTGA 3'
<i>PR1</i>	5' ACTCAAGTAGTCTGGCGCAACTCA 3'	5' AGTAAGGACGTTGTCCGATCGAGT 3'
<i>P23</i>	5' TTCGAGGTACGCAACAACTG 3'	5' ATGCATTGATGACCCATGTTT 3'
<i>Solyc12g036793</i>	5' TCATTGCCCTTGTGTTCTTG 3'	5' TGTTTGGGTCTGCCACATTA 3'
<i>Solyc06g066590</i>	5' ATGACGGCGTTCTTACCTTG 3'	5' GCAGGCATCATCAGCATGTA 3'
<i>Solyc03g093890</i>	5' CCGGAGGAAGACCAAAAACT 3'	5' CAACTTTTCCCCGTTCTTGA 3'
<i>Solyc08g062490</i>	5' GGTGCTCAGTGAAGGTTGT 3'	5' GGACCTTGATGGTTGTGGAC 3'
<i>Solyc05g015850</i>	5' TTTCCATCAGCATCATCGTC 3'	5' GGCCTTATTCTTCCCTTGGA 3'
<i>Solyc05g007770</i>	5' GTTTGAGGCCAAAAGGAA 3'	5' TCAAGTGGCGTTCTCAACAG 3'
<i>Solyc04g005610</i>	5' GCATCGCATATTGACAACCA 3'	5' GTCTGGCAAGCCAAAGAGAG 3'
<i>Solyc04g007170</i>	5' GGAAGGCTACTGGCACTGAT 3'	5' TGACACCTTTTGGTGGTTTG 3'
<i>Solyc10g080770</i>	5' ATCACCTCCCTCCTGGATTT 3'	5' AGACATCAACTTCGGGGATG 3'
<i>Solyc08g081620</i>	5' GAGCCTCATCACTCCCTTCA 3'	5' GCACCGACATGTGTGTTAGG 3'
<i>Solyc12g011280</i>	5' TAGGCCATTCTCTGGTGAG 3'	5' GCAAAAAGTTTCAGGGTCAGC 3'
<i>Solyc10g006900</i>	5' ACCACGAAGAGACTGGCATC 3'	5' ATGGAGGGAAAAGGAGCCTA 3'
<i>Solyc06g069730</i>	5' CCCTGGAAGTGTGAACCAAG 3'	5' TGCAAAGTTGAGTGGGTTGA 3'
<i>Solyc10g086720</i>	5' TGTGGAGCAGAGGTGCATAG 3'	5' CGTGAGCACGAAGATCACTG 3'
<i>Solyc01g110940</i>	5' GGGAGCAGCAGAAGAAGAGA 3'	5' CCACCCATTGGATGATTGA 3'
<i>Solyc01g112260</i>	5' TTTGCCAACGATCTGGAAAT 3'	5' GCAGCTCCGACCTATTTTG 3'
<i>Solyc04g017720</i>	5' GCCAAAAATGTTGTGCAAAG 3'	5' CATTTTGGGCCTCTCTCTT 3'
<i>Actina</i>	5'CTAGGGTGGGTTTCGAGGAGATGATGC 3'	5' GTCTTTTGGACCCATACCCACCATCACAC 3'

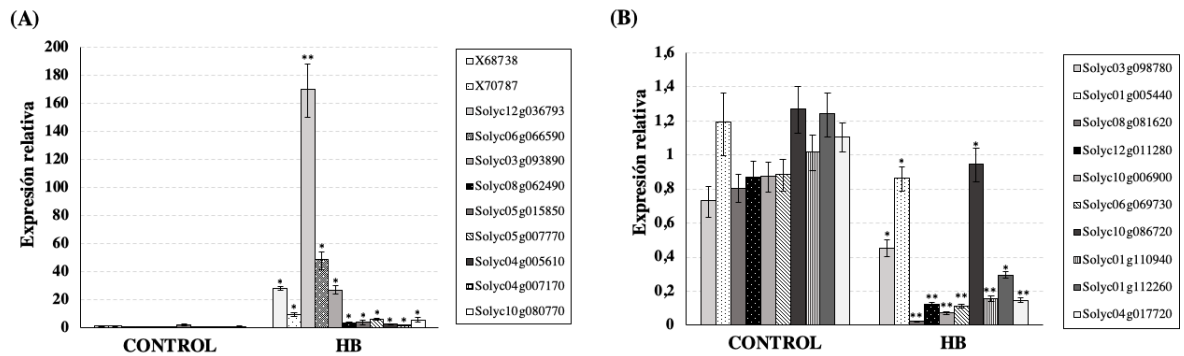


Figura S3 : Validación de genes relevantes del experimento RNA-Seq mediante qRT-PCR. Nivel de expresión de los genes inducidos (A) o reprimidos (B) de plantas de tomate Flora-Dade tratadas (HB) o no (CONTROL) con butanoato de (Z)-3-hexenilo. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen *actina*. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de dos plantas independientes de un experimento representativo. Se llevó a cabo un *t-test*. El asterisco (*) y doble asterisco (**) indican que hay diferencias significativas con un *p-value* < 0.05 y *p-value* < 0.01 entre las plantas control y las plantas tratadas, respectivamente.



A New Role For Green Leaf Volatile Esters in Tomato Stomatal Defense Against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

María Pilar López-Gresa^{1†}, Celia Payá^{1†}, Miguel Ozáez¹, Ismael Rodrigo¹, Vicente Conejero¹, Harry Klee², José María Bellés¹ and Purificación Lisón^{1*}

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain, ² Horticultural Sciences Department, University of Florida, Gainesville, FL, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Laure Weisskopf,
Université de Fribourg, Switzerland

Reviewed by:

Selena Gimenez-Ibanez,
Centro Nacional de Biotecnología
(CNB), Spain
William Underwood,
Agricultural Research Service (USDA),
United States
Ömür Baysal,
Muğla University, Turkey

*Correspondence:

Purificación Lisón
plison@ibmcp.upv.es

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Microbe Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 12 July 2018

Accepted: 30 November 2018

Published: 18 December 2018

Citation:

López-Gresa MP, Payá C, Ozáez M,
Rodrigo I, Conejero V, Klee H,
Bellés JM and Lisón P (2018) A New
Role For Green Leaf Volatile Esters in
Tomato Stomatal Defense Against
Pseudomonas syringae pv. *tomato*.
Front. Plant Sci. 9:1855.
doi: 10.3389/fpls.2018.01855

The volatile esters of (Z)-3-hexenol with acetic, propionic, isobutyric, or butyric acids are synthesized by alcohol acyltransferases (AAT) in plants. These compounds are differentially emitted when tomato plants are efficiently resisting an infection with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. We have studied the defensive role of these green leaf volatile (GLV) esters in the tomato response to bacterial infection, by analyzing the induction of resistance mediated by these GLVs and the phenotype upon bacterial infection of tomato plants impaired in their biosynthesis. We observed that treatments of plants with (Z)-3-hexenyl propionate (HP) and, to a greater extent with (Z)-3-hexenyl butyrate (HB), resulted in stomatal closure, PR gene induction and enhanced resistance to the bacteria. HB-mediated stomatal closure was also effective in several plant species belonging to *Nicotiana*, *Arabidopsis*, *Medicago*, *Zea* and *Citrus* genus, and both stomatal closure and resistance were induced in HB-treated *NahG* tomato plants, which are deficient in salicylic acid (SA) accumulation. Transgenic antisense *AAT1* tomato plants, which displayed a reduction of ester emissions upon bacterial infection in leaves, exhibited a lower ratio of stomatal closure and were hyper-susceptible to bacterial infection. Our results confirm the role of GLV esters in plant immunity, uncovering a SA-independent effect of HB in stomatal defense. Moreover, we identified HB as a natural stomatal closure compound with potential agricultural applications.

Keywords: AAT1, GLV esters, stomata, defense, tomato, bacteria

INTRODUCTION

Plants synthesize different defensive secondary metabolites in response to biotic stresses. These compounds may exert direct defensive functions by acting on the pathogen, or act indirectly by activating the defensive response of the plant. Some volatile organic compounds (VOCs) belong to this group of defensive molecules. These VOCs are typically lipophilic liquids with high vapor pressures that can freely cross membranes and be emitted (Dudareva et al., 2006).

The defensive role of VOCs has been classically associated with plant defense against herbivores. Emitted volatiles can directly affect herbivores due to their toxic, repelling or deterring properties (Kessler and Baldwin, 2001; Aharoni et al., 2003). They can also attract predators of the attacking

insects, thus displaying tritrophic interactions (Drukker et al., 2000; Kessler and Baldwin, 2001). VOCs can also prime defenses in neighboring plants, constituting mechanisms of interplant communication (Kim and Felton, 2013). Although the roles of VOCs in pathogen defense have received less attention, some volatiles have been implicated in different plant-pathogen interactions (Croft et al., 1993; Huang et al., 2003; Cardoza and Tumlinson, 2006; Niinemets et al., 2013; Hijaz et al., 2016; Ameze et al., 2018).

Recently, a GC-MS metabolomic analysis revealed a number of VOCs that are differentially emitted by tomato cv. Rio Grande plants containing the *Pto* gene, upon infection with virulent or avirulent strains of the bacterium *Pseudomonas syringae* DC3000 pv. *tomato* (*Pst*) (López-Gresa et al., 2017). Infection of this cultivar with avirulent bacteria, carrying both AvrPto and AvrPtoB effectors, elicits establishment of Effector Triggered Immunity (ETI) in the plant, thus preventing development of the infection (Dangl and Jones, 2001; Lin and Martin, 2005). Metabolomic analysis showed that esters of (*Z*)-3-hexenol with acetic (HA), propionic (HP), isobutyric (HiB) or butyric (HB) acids were differentially emitted during ETI (López-Gresa et al., 2017).

These esters belong to the family of green leaf volatiles (GLVs) that are generated through the oxylipin pathway from C18 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as linolenic or linoleic acids. The first step in their biosynthesis is peroxidation of the PUFAs performed by the action of lipoxygenases (LOXs). These enzymes can act upon PUFAs at either the C9 or C13 position, being classified as 9-LOX and 13-LOX, respectively. GLV esters are known to be synthesized by 13-LOX via 13-hydroperoxides that are later cleaved by 13-hydroperoxide lyases (13-HPL) into (*Z*)-3-hexenal. This aldehyde is reduced by an alcohol dehydrogenase (ADH), and alcohol acyltransferases (AAT) catalyze esterification of an acyl moiety from an acyl-coenzyme A (acyl-CoA) donor onto an alcohol (Scala et al., 2013; Ameze et al., 2018).

Five alcohol acyltransferase genes (*SLAAT1-5*) have been identified in tomato (Goulet et al., 2015). To confirm the function of this protein, tomato plants containing an *AAT1* antisense construct (*as-AAT1*) were generated, resulting in transgenic fruits with reduced acetate ester emissions (Goulet et al., 2015). Consistent with this biochemical activity and the metabolomic data, tomato plants triggering ETI and differentially emitting these GLV esters, significantly induced *AAT1* expression (López-Gresa et al., 2017). These results suggest a possible role of this enzyme and its products in plant defense.

Many foliar pathogens, including bacteria, primarily invade plants through natural surface opening such as wounds or stomata. Plants have developed the ability to restrict entry of pathogens by closing stomata or by inhibition of stomatal opening (Arnaud and Hwang, 2015). Specifically, *Pst* has been observed to activate plant stomatal closure. To evade this innate immune response, *Pst* has evolved specific virulence factors, including coronatine, to effectively cause stomatal reopening. Coronatine is a mimic of the active JA-Ile hormone, and acts as a suppressor of stomata closing by inhibiting SA-induced closing of stomata. Abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA)

have emerged as positive regulators of stomatal defense, while jasmonic acid (JA) is a negative regulator (Melotto et al., 2006, 2008) reviewed in Panchal and Melotto (2017). Although stomata closing is regulated by master ABA and SA signals, it is becoming clear that during biotic interactions, SA is produced upon *Pst* sensing, triggering stomata closing. This SA-induced stomata closing is hijacked by the COR phytotoxin, through the antagonistic the SA-JA crosstalk (Zheng et al., 2012; Gimenez-Ibanez et al., 2017).

To study the possible defensive role of the GLV esters differentially emitted by tomato plants resisting bacterial infection we used a pharmacological approach, assessing the induction of resistance mediated by exogenous treatment with these volatiles. We also examined the mode of action of these compounds and the possible activation of the salicylic acid (SA) pathway caused by VOC treatments. To confirm the defensive role of VOCs, we also used a genetic approach by studying the phenotype of *as-AAT1* tomato plants upon bacterial infection. Our results confirm the role of GLV esters in plant immunity, uncovering a new function of VOCs in stomatal defense. The effect on stomatal aperture of one of these GLV esters was also studied in several plant species, defining a potential use in agriculture.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and GLV Treatments

We used in this study the following tomato plants: *NahG* (Brading et al., 2000) and their corresponding parental MoneyMaker plants; *as-AAT1* (Goulet et al., 2015) and *Flora-Dade* (FD) parental plants; and Rio Grande plants, the only variety containing the *Pto* resistance gene.

The seeds were sterilized with a 1:1 mixture of commercial sodium hypochlorite and distilled H₂O containing a few drops of Tween 20, and then they were sequentially washed with distilled H₂O during 5, 10, and 15 min, respectively. After sterilization treatments, seeds were placed in 12 cm-diameter pots that contained a 1:1 mixture of vermiculite and peat and grown under greenhouse conditions with a relative humidity between 50 and 70% and a 16/8 h (26/30°C) light/dark photoperiod.

Four-week-old tomato plants were treated with (*Z*)-3-hexenyl acetate (HA), (*Z*)-3-hexenyl propionate (HP), (*Z*)-3-hexenyl butyrate (HB), and (*Z*)-3-hexenyl isobutyrate (HiB) into 110 L methacrylate chambers. A concentration of 5 μM of each compound was placed in different hydrophilic cotton buds, and distilled H₂O in the case of the control plants. To avoid VOC mixtures, the treatments were performed individually. Methacrylate chambers were hermetically sealed during the 24 h treatment.

Bacterial Strain, Bacterial Inoculation and CFU Determination

The bacterial strains used in this study were *Pst* DC3000, and *Pst* DC3000 containing deletions in genes *avrPto* and *avrPtoB* (*Pst* DC3000 Δ *avrPto*/ Δ *avrPtoB*) (Lin and Martin, 2005; Ntoukakis et al., 2009). Bacteria were grown during 48 h at 28°C in LB agar medium with different antibiotics: rifampicin (10 mg/mL)

and kanamycin (0.5 mg/mL) for *Pst* DC3000, and rifampicin (10 mg/mL), kanamycin (0.25 mg/mL), and spectinomycin (2.5 mg/mL) for *Pst* DC3000 $\Delta avrPto/\Delta avrPtoB$. When colonies were grown, they were transferred into 3 mL of King's B liquid medium supplemented with rifampicin and were grown overnight at 28°C under continuous stirring. After 24 h, colonies were transferred into 14 mL of King's B liquid medium and were grown under the same conditions than the previous step. Then, bacteria were centrifugated 15 min at 3,000 rpm and resuspended in 10 mM sterile MgCl₂ to an optical density of 0.1 at 600 nm, which corresponds to a final inoculum concentration of 5×10^7 CFU/mL approximately.

Inoculation with bacteria was carried out in 4-week-old tomato plants by immersion or injection methods. For immersion experiments tomato plants were dipped into the bacterial suspension containing 0.05% Silwet L-77. To carry out bacterial injection experiments, each leaflet of the third and fourth leaves was inoculated with a needleless syringe by injecting the bacterial suspension into different sites of the leaflet's abaxial side.

For determining bacterial growth, three leaf disks (1 cm² each) were sampled from the bacterial infected leaves from each plant. A total of five plants were used per treatment or tomato plant variety. Density of bacterial populations was determined by plating serial dilutions of the infected material on King's B medium containing rifampicin and counting colony growth.

Stomatal Aperture Measurement

Tomato leaf impressions were obtained by applying a thin layer of nitrocellulose-based glue (Imedio, Bolton Group, Madrid, Spain) in the abaxial part of the leaves, and then peeling off the glue carefully. In order to observe the stomata, epidermis peels were placed on glass slides and observed under a Leica DC5000 microscope (Leica Microsystems S.L.U.). Pictures of different regions of tomato leaves were taken and at least 50 stomata of each plant and/or each treatment were analyzed using the NIH's *ImageJ* software. Stomatal aperture ratio was calculated as stomata width/stomata length.

RNA Extraction and Quantitative RT-PCR Analysis

Total RNA extraction of tomato leaves was produced using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) following the manufacturer's protocol. Then, RNA was precipitated by adding one volume of 6 M LiCl for 3 h. Thereafter the pellet was washed using 1 volume of 3 M LiCl and resuspended in RNase-free water. So as to remove genomic DNA, 2 U/ μ L RNA of TURBO DNase kit (Ambion, Austin, TX, United States) was utilized.

PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time, Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) was used to obtain the cDNA from one microgram of total RNA, according to the manufacturer's protocol. Quantitative real-time PCRs were performed as previously described (Campos et al., 2014), in 10 μ L reaction volume on 96-wells plates using SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Actin gene was used as the endogenous reference gene in all the experiments. Three technical replicates

were performed in all the assays. The PCR primers are listed in Table S1.

HS-SPME Extraction and GC-MS Analysis of Volatile Compounds

For the analysis of the volatile compounds, 100 mg of fully homogenized, frozen tomato leaf tissue were introduced into a 10 mL glass vial, adding subsequently 1 mL of a saturated CaCl₂ solution and 100 μ L of 750 mM EDTA at a pH of 7.5. The vial was air-tight sealed and sonicated for 5 min and volatile compounds extraction was performed by Head Space Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) (López-Gresa et al., 2017). The samples were incubated for 10 min at 50°C and the extraction was performed at the same temperature for 20 min with a PDMS/DVB fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The desorption of the adhered compounds was carried out for 1 min at 250°C in splitless mode. Solid phase microextraction was performed using a CombiPAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland).

VOCs were analyzed using an Agilent 6890N (Santa Clara, CA, USA) gas chromatograph coupled to an Agilent 5975B Inert XL electronic impact (EI) mass detector with an ionization energy of 70 eV and a source temperature of 230°C. Chromatography was carried out on a DB-5-MS fused silica capillary column (60 m long, 0.25 mm i.d., 1 μ m film thickness). The temperature conditions established in the oven were 40°C for 2 min, a ramp from 5°C/min to 250°C and 5 min at a constant temperature of 250°C. The carrier gas was helium at a constant flow of 1.2 mL/min. Data acquisition was performed at 6 scans per second in an *m/z* range of 35–250. Chromatograms and mass spectra were acquired and processed using the Enhanced ChemStation software (Agilent).

Identification of the compounds was performed by using commercial compounds that served as standards. The compounds used as reference or standard were purchased in Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) or chemically synthesized by the Metabolomics service of the IBMCP as is the case of (*Z*)-3-hexenol esters (González-Mas et al., 2011). Quantification of HA, HB, HP, and HiB was performed by standard curves using such pure compounds.

HB Treatments in Different Species

Nicotiana benthamiana, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Zea mays*, and *Citrus x jambhiri* plants were treated with (*Z*)-3-hexenyl butyrate (HB). For this purpose, plants were treated by spraying them at a concentration of 2 mM containing 0.05% Silwet L-77. Tomato plants were also sprayed as a positive control. Samples were taken before the treatment, and 24 and 48 h post-treatment in order to determine stomatal aperture ratio (as previously described).

In vitro Antimicrobial Activity Assays

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 $\Delta avrPto$ bacterial strains were grown in LB agar medium during 48 h and then transferred into 15 mL of King's B liquid medium, as previously described. After 24 h, 1 mL of the bacterial culture was mixed with 14 mL of King's B agar and poured into Petri dishes. Once

solidified, 5 mm-diameter Whatman paper disks (GB005 Blotting Paper, Schleicher & Schuell) were placed on top of the agar and then a volume of 10 μ L of each compound [(*Z*)-3-hexenyl acetate (HA), (*Z*)-3-hexenyl propionate (HP), (*Z*)-3-hexenyl butyrate (HB), (*Z*)-3-hexenyl isobutyrate (HiB), (*Z*)-3-hexenal, and (*E*)-2-hexenal] was applied into the disks. Methanol was used as negative control and the antibiotic tetracycline was chosen for the positive one at two different concentrations (50 and 100%).

After incubation during 48 h at 28°C, the inhibition zone was measured using a slide gauge.

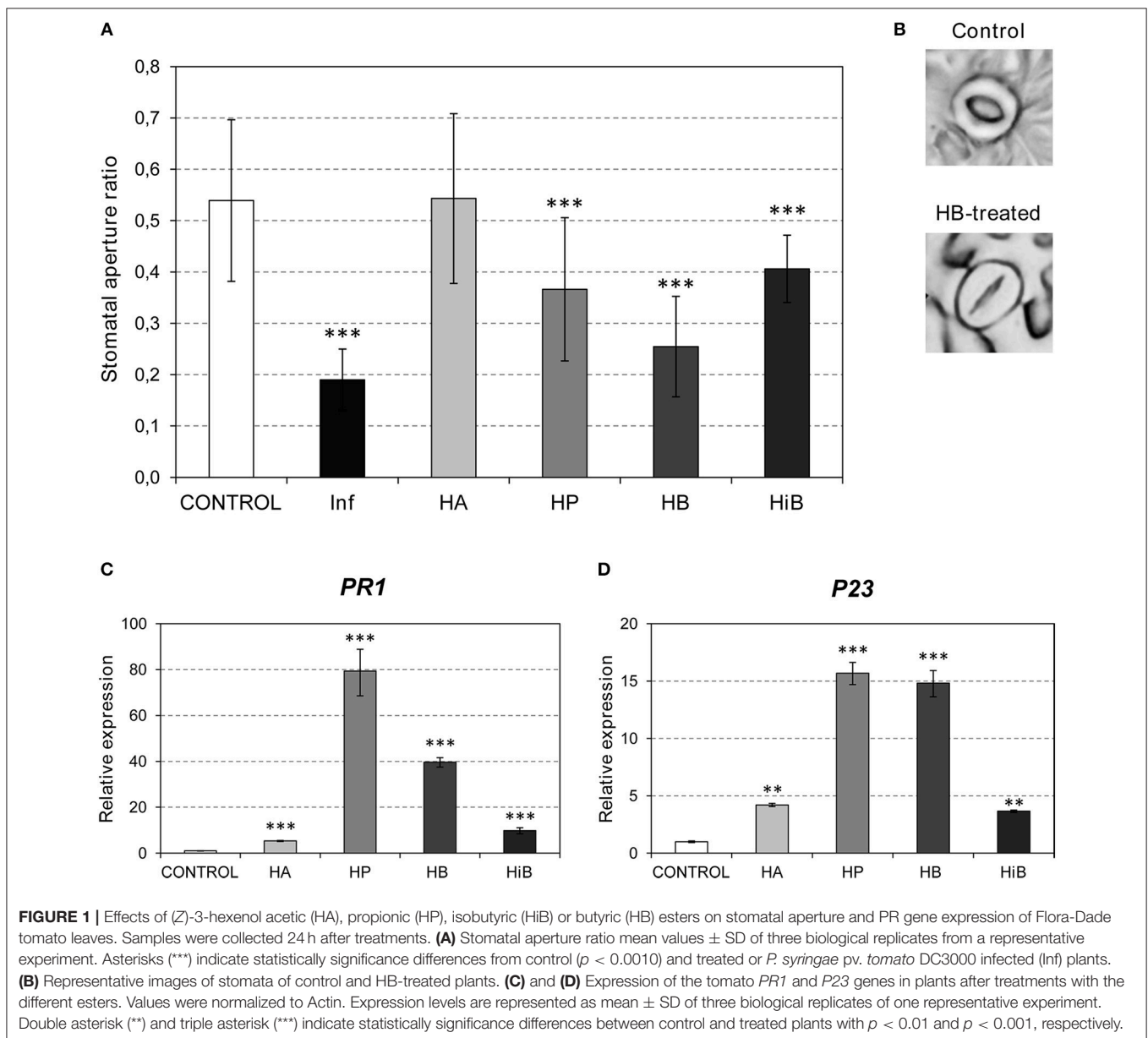
Statistical Analysis

Statistical analyses of two or more variables were performed by using Student's *t*-test or analysis of variance (multifactor ANOVA), respectively (Statgraphics Centurion XVI).

For untargeted analysis of the volatile profile, GC-MS data were processed with the MetAlign software (Wageningen, The Netherlands) for alignment of chromatograms and quantitation of each of the MS features. The resulting dataset was submitted to a Partial Least Square (PLS) study by means of the SIMCA-P software v. 11.0 (Umetrics, Umeå, Sweden) using unit variance (UV) scaling.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL and Solgenomics data libraries under accession numbers *PR1* (X68738), *P23* (X70787), *AAT1* (KM975321), *JAZ7* (Solyc11g011030), *JAZ9* (Solyc08g036640), *P5CS* (Solyc06g019170), *RAB18* (Solyc02g084850), and *Actin* (AB695290; Solyc04g011500).



RESULTS

Exogenous Treatments With GLV Esters Close Stomata and Induce PR Gene Expression

Bacterial pathogens and VOCs invade the plant through stomata (Matsui, 2016; Panchal and Melotto, 2017). We decided to test the defensive role of GLV esters by studying the effect of exogenous treatments with these volatiles on stomatal closure. Treatments with HA, HP, HB, and HiB were performed on tomato cv. Flora-Dade plants (see Materials and Methods) and the stomatal aperture ratios were measured 24 h after treatment. As observed in **Figures 1A,B**, treatment with HB produced significant stomatal closure, reaching aperture ratios comparable to those observed in bacterial infected leaves (Lisón et al., 2017). A similar effect was detected when treatments were performed with HP or HiB, although lower effects were observed when compared with those observed for HB. However, HA had no clear effect on stomatal closure, indicating that the effect on stomatal closure is ester-specific. Interestingly, HA was the only ester displaying an antibacterial defensive role, as shown in **Figure S1**.

Several signal molecules have been implicated in plant immunity. SA has been mainly associated with resistance against biotrophic and hemibiotrophic microbes such as *Pst*, while the JA pathway activates resistance against necrotrophs in *Arabidopsis* (Robert-Seilaniantz et al., 2011). To test the VOC-mediated activation of these pathways, we studied the induction of several marker genes. *PR1* and *P23* (Rodrigo et al., 1993; Tornero et al., 1993) were used as markers for the plant response to biotrophic pathogens. To study the involvement of the JA pathway, *JAZ* genes (Ishiga et al., 2013) and *TCI21* (Lisón et al., 2006) were used. Since ABA has been classically associated with stomatal closure, the induction of *RAB18* and *P5CS1* was also analyzed (González-Guzmán et al., 2014). As shown in **Figures 1C,D**, induction of *PR1* and *P23* was observed in the plants treated with any of the VOCs, with HP provoking the highest induction of both PR genes. Interestingly, the markers associated with the ABA pathway were not activated by treatments with any of the GLV esters (**Figure S2**). In contrast, both *JAZ7* and *TCI21* were repressed by HB, but clearly induced in the HiB-treated plants. These results suggest that the stomatal closure caused by HP, HB, and HiB is not accompanied by activation of the ABA pathway, and that the JA pathway is repressed by HB and activated by HiB. Nevertheless, all of the GLV esters appeared to induce the SA pathway (**Figures 1C,D**).

Treatment With (Z)-3-hexenyl-butyrate Induces Resistance to *Pst* in Tomato in a SA-Independent Manner

Based on the observed results, we decided to test whether the observed VOC-mediated PR induction and stomatal closure increases resistance to bacterial infection. To that purpose, tomato plants were pre-treated with VOCs for 24 h and subsequently infected with *Pst*. Only treatments with HP and HB significantly reduced bacterial growth (**Figure 2A**). These results appear to indicate that the stomatal closure accounts very

importantly for the tomato resistance to bacteria (**Figure 1A**). Although HA displayed antibacterial properties (**Figure S1**) and HiB induced PR1 and P23 (**Figures 1C,D**), any of these two VOCs could enhance the tomato resistance to *Pst*. In this sense, the highest resistance observed in the HB-treated plants, with a clear effect also in the observed symptomatology (**Figure 2B**), correlated with the highest efficacy of this VOC on stomatal closure. Our results suggest that HB, and to a lesser extend HP, effectively lead to resistance, confirming an indirect defensive role of both GLV esters.

Beyond its role as a signaling molecule for plant defense responses to bacterial pathogens, SA is a positive regulator of stomatal defense (Panchal and Melotto, 2017). To test if the observed HB-induced stomatal closure is SA-dependent, we studied its effect in *NahG* tomato plants, which are impaired in SA accumulation (Brading et al., 2000).

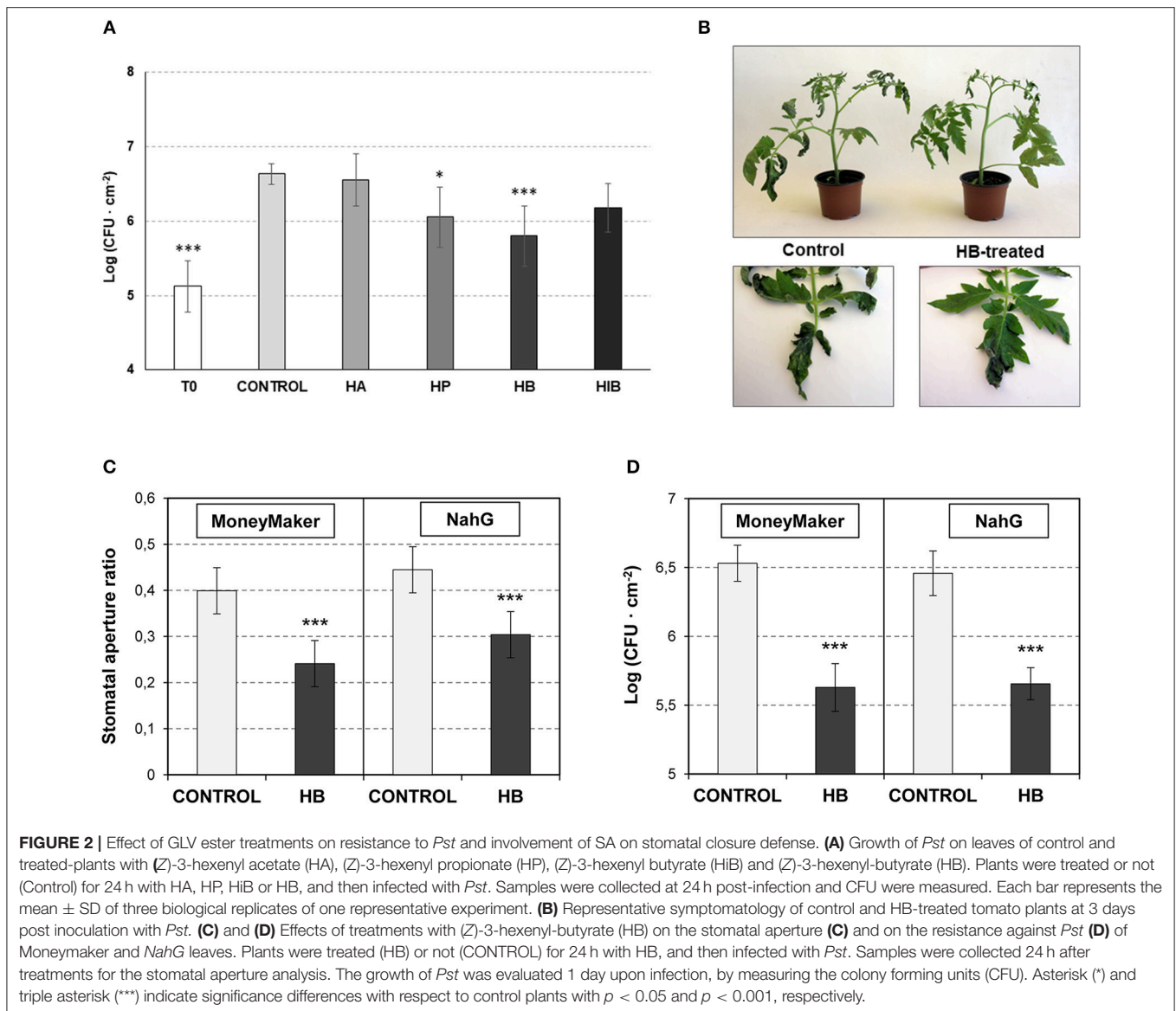
NahG plants and their corresponding Moneymaker parental control were pre-treated with HB for 24 h and subsequently infected with *Pst*. Stomatal aperture ratio and bacterial growth were measured at 24 h post-inoculation. HB treatment resulted in a significant stomatal closure and reduced bacterial growth in *NahG* (**Figures 2C,D**), indicating that the effect of HB is SA-independent.

Antisense *as-AAT1* Plants Are More Susceptible to *Pst* Displaying a Reduction of *AAT1* but No Difference in *PR1* Upon Infection With *Pst*

To better understand the relationship between GLVs and pathogen defense, we examined plants that are impaired in their ability to synthesize GLVs. The last reaction for the biosynthesis of GLVs is carried out by an alcohol acyltransferase (AAT). In tomato, there are five AAT-encoding genes but only one, *SIAAT1*, accounts for almost all of the expression in fruit, and antisense *SIAAT1* fruits produce almost no detectable alcohol esters (Goulet et al., 2015).

To determine whether *SIAAT1* has an active role in plant defense, two independent *as-AAT1* transgenic lines (*AAT 3677* and *AAT 3936*) (Goulet et al., 2015) were infected with *Pst*, and the bacterial populations were measured and compared to the corresponding Flora-Dade control plants. As shown in **Figure 3A**, *as-AAT1* plants had significantly more bacterial growth at 24 hpi than did the control plants. Electrolyte leakage, which is a hallmark of cell death, was also significantly increased in both *as-AAT1* transgenic lines (**Figure 3B**). Our results indicate that reduced expression of *SIAAT1* strongly compromises the defense response against *Pst*.

To characterize the response of *as-AAT1* tomato plants to *Pst* infection, the expression of different genes in *as-AAT1* lines and Flora-Dade plants either mock-inoculated or infected with *Pst* at 24 and 48 hpi was analyzed by qRT-PCR (**Figure S3**). As previously described in cv. Rio Grande tomato plants (López-Gresa et al., 2017), there was an increase in *SIAAT1* transcript in *Pst*-infected Flora-Dade leaves when compared to the mock-inoculated plants, at both 24 and 48 hpi. In contrast, a clear reduction in *SIAAT1* was observed in *as-AAT1*



leaves relative to the Flora-Dade control plants in all conditions (Figure S3A).

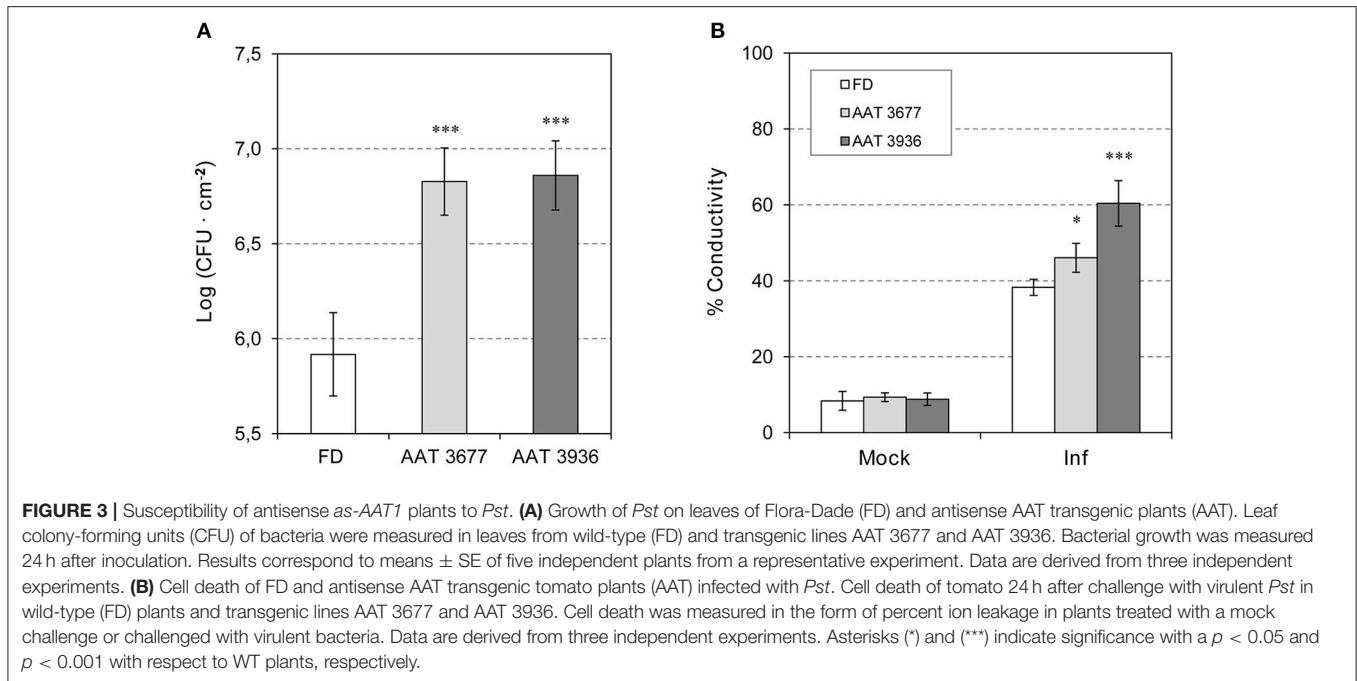
We also studied the induction of *PR1*, observing that activation of this gene only occurs in the presence of the bacteria, being stronger at 48 hpi (Figure S3B). No significant differences in the induction of *PR1* between Flora-Dade and the *as-AAT1* lines were observed after *Pst* infection. These results suggest that the enhanced susceptibility observed in *as-AAT1* transgenic plants correlated with lower expression of *AAT1*, but not with the pathogenesis marker *PR1*.

Antisense *as-AAT1* Plants Emit Less GLV Esters and Display an Impaired Stomatal Closure Upon *Pst* Infection

In order to correlate the observed phenotype with the differential emission of GLV esters, volatiles produced by *as-AAT1* and

Flora-Dade leaves either mock-inoculated or infected with *Pst* at 24 and 48 hpi were analyzed by GC-MS.

To manage the large amount of mass data, a multivariate data analysis was performed. In particular, a partial least square analysis (PLS) was carried out, defining compound abundance as the X variable, and harvest time (24 and 48 hpi) and genotype (FD; AAT 3677 and AAT 3936) as stepwise Y variables. The PLS analysis (Figure S4) showed that the first component (PC1) explained changes in the chemical composition along the time course of the infection (harvest time) while the metabolic alterations due to the genotype were clearly characterized by the second component (PC2). Both *as-AAT1* infected transgenic samples showed an evident variation in their metabolic content compared to FD infected plants. The analysis of loading scatter plot identified the GLV esters as the main compounds contributing to the separation of the samples.



Levels of (*Z*)-3-hexenyl-acetate, -propionate, -isobutyrate, and -butyrate were specifically quantified. As shown in **Figure S5**, these four esters of (*Z*)-3-hexenol were differentially emitted by Flora-Dade plants upon infection with *Pst*, thus extending the previously described emission observed in Rio Grande plants (López-Gresa et al., 2017) to other tomato cultivars. It is worth noting that (*Z*)-3-hexenyl-butyrate displayed the highest levels of emission (around 50 ppm) in Flora-Dade leaves 24 h after the *Pst* inoculation, reaching values even higher than those used for the HB treatments (around 1 ppm). As expected, both *as-AAT1* lines infected with *Pst* differentially emitted less GLV esters when compared with the corresponding Flora-Dade infected plants, displaying levels of emission similar to the mock-inoculated *as-AAT1* leaves. Our results suggest that these GLVs may play a defensive role in tomato plants against bacterial infection.

To study the possible effect of GLV esters on bacterial-mediated stomatal closure, we measured the stomatal aperture ratio in *as-AAT1* and Flora-Dade leaves, both before and 24 h after bacterial infection. As shown in **Figure 4**, before infection, both *as-AAT1* lines had similar ratios of stomatal aperture to Flora-Dade. However, the stomata of Flora-Dade leaves displayed a reduction in the aperture ratio after *Pst* infection. Interestingly, stomatal closure did not occur in *as-AAT1* infected leaves, exhibiting stomatal aperture ratios significantly higher than those observed in the Flora-Dade infected leaves. Our results are consistent with a model in which the increased susceptibility in *as-AAT1* against *Pst* is caused by the reduced ability of these plants to close stomata upon infection due to the lack of the GLV esters emission in these plants. These results uncover a role of GLV esters, and particularly, of HB in stomatal defense.

The GLV Esters Defense Role Is Mainly Due to Their Stomata Closure Effect

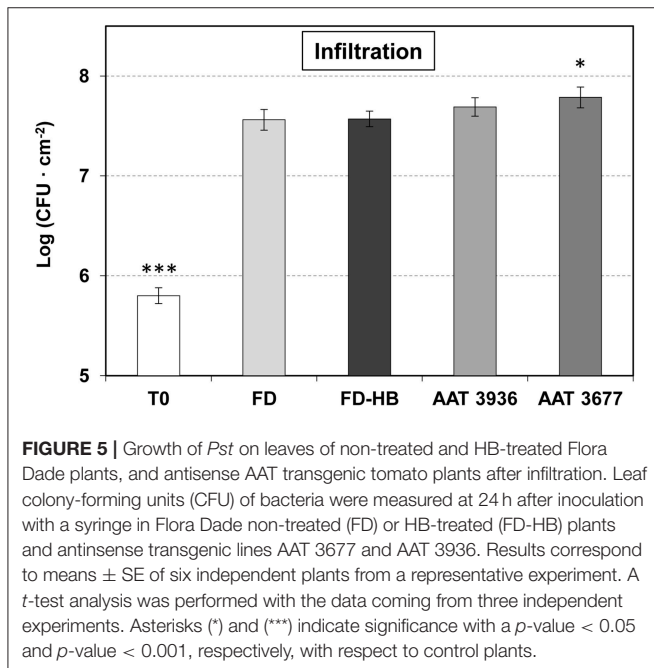
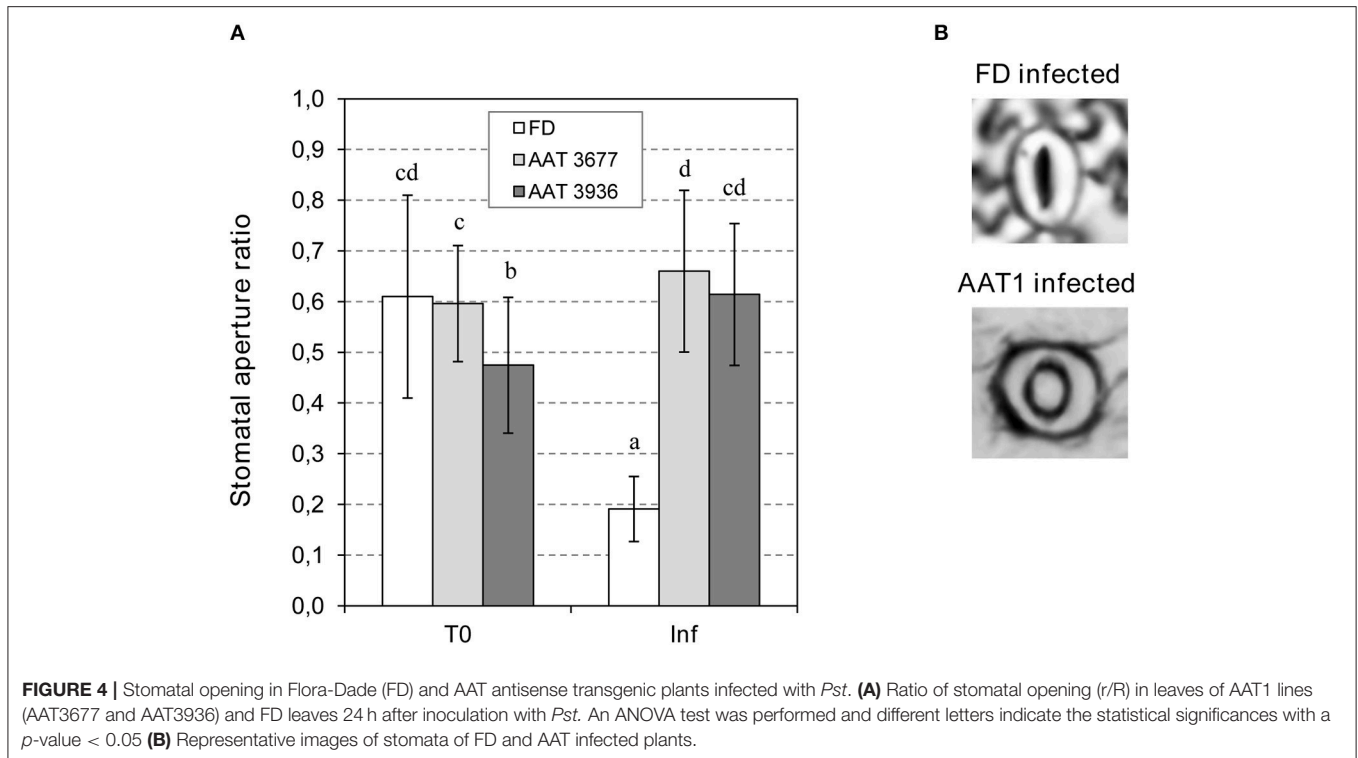
To test if the observed GLV esters defense role was only due to a reduction in stomatal closure, or other factors could be intervening, non-treated and HB-treated tomato Flora-Dade plants were infected by infiltration with a syringe (**Figure 5**). In this case, the bacteria bypass the stomatal defense and directly enter the apoplast. As expected, forced infiltration resulted in higher levels of bacterial growth, when compared to the plants infected by immersion (**Figure 3**). As **Figure 5** shows, no statistical differences in the bacterial content were observed after HB treatments, thus indicating that the HB-induced resistance mainly depends on the stomata closure effect.

To better confirm this idea, *as-AAT1* plants were also infiltrated with *Pst* (**Figure 5**), observing a clear reduction in the hypersusceptibility, that was previously detected by immersion (**Figure 3**). Consistently a similar induction of *PRI* was observed in both Flora-Dade and *as-AAT1* plants infected with the bacteria (**Figure S3B**), thus suggesting that the phenotype is not due to reduced activation of plant defense, but to a reduced ability to close stomata in the *as-AAT1* plants.

All these results confirm the role of Green Leaf Volatile esters in tomato stomatal defense against *Pst*.

Rio Grande Tomato Plants Displaying ETI Exhibit a Slightly Higher Stomatal Closure

Since Rio Grande ETI-displaying tomato plants differentially emit GLV esters at 1 h, 4 h (**Figure S6**), and 24 h post-inoculation (López-Gresa et al., 2017), and treatments with some of them produce stomatal closure (**Figure 1**), we decided to study the stomatal behavior in plants displaying ETI, compared with



those infected with the virulent bacteria. To that purpose, Rio Grande tomato plants carrying the *Pto* gene were infected with an avirulent or a virulent strain of *Pst*, carrying the *AvrPto* gene or a deleted version of it, respectively (see Materials and Methods). The stomatal closure ratios were measured at 1, 4, and 24 h post-inoculation (Figure S7). In correlation with

the differentially emitted levels of GLV esters, tomato plants displaying ETI appeared to exhibit a slightly higher stomatal closure at the early analyzed times.

HB Treatments Produce a Maximum Stomatal Closure at 24 h in Tomato Plants and It Is Also Effective in Several Plant Species

To study the most effective time point for the HB-induced stomata closure, measures of stomata ratios were analyzed in control and HB treated tomato leaves at 6, 10, 24, 48, 72 h post-treatment (hpt), and at 7 and 10 days post-treatment (dpt). As Figure 6A indicates, HB was already effective at 6 hpt, displaying a maximum stomata closure effect at 24 hpt. At this time point, the ratio in HB-treated plants decreased to half of that displayed by the control plants, thus indicating a very pronounced effect of the GLV ester in tomato plants. The resistance of the HB-treated plants was precisely studied after 24 h of treatment (Figure 2A). The durability of the effect remained till 10 dpt, at which the differences between stomata ratios of control and HB-treated plants were not significant.

Once we had demonstrated that HB is a defensive VOC associated with stomatal closure in tomato, with a maximum effect at 24 hpt, we evaluated the effect of this GLV ester in other plant species, including *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Zea mays*, and *Citrus x jambhiri*. To that end, HB treatments were performed by spraying these species, including tomato plants as a positive control, and measuring stomatal aperture ratios before and 24 or 48 h after

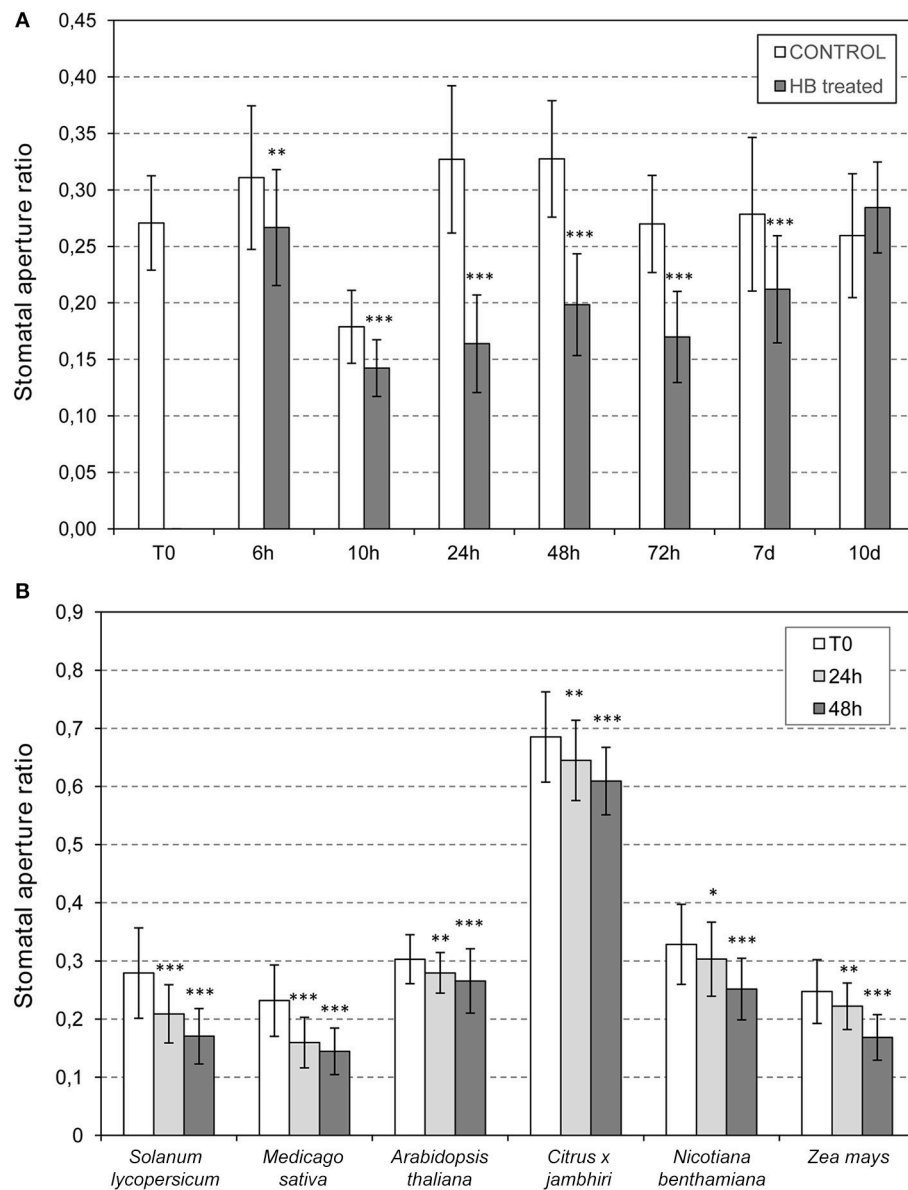


FIGURE 6 | Stomatal opening in plants treated with (Z)-3-hexenyl-butyrate (HB). **(A)** Time course analysis of the (HB) effect on tomato stomata closure. Stomata ratios were analyzed in non-treated (control) and HB-treated (HB) tomato leaves at 0 (T0), 6, 10, 24, 48, 72 h post-treatment (h), and at 7 and 10 days post-treatment (d). **(B)** Effectivity of HB treatments in different species. Samples were collected 24 or 48 h after treatments. Asterisk (*), double asterisks (**) and triple asterisks (***) indicate significant differences between control and HB-treated plants with $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

HB treatment (**Figure 6B**). The treatments produced significant stomatal closure in all the species tested, thus indicating that HB is a universal stomata closer, extending its uses to Solanaceae, Brassicaceae, Fabaceae, Poaceae, and Rutaceae (Lisón et al., 2017). It is worth noting that, despite being significant, the observed effect in *Arabidopsis* was lower than what was observed in the rest of the analyzed species.

Our results support a model in which VOC ester synthesis is stimulated by the presence of *Pst*, triggering stomatal closure that limits entry of *Pst* into leaves and limits subsequent disease symptom development.

DISCUSSION

Green leaf volatiles (GLVs) consist of a family of C6 compounds, including aldehydes, alcohols, and esters, which are abundantly produced across the plant kingdom. Although the defensive role of GLVs has been classically associated with plant-herbivore interaction, it has been recently described that pathogens also provoke a higher emission of these plant volatiles (Ameje et al., 2018). In particular, some GLV esters are differentially emitted by tomato plants during establishment of the ETI triggered by *Pst* (López-Gresa et al., 2017). A direct defensive role of

GLVs against pathogens has been demonstrated, since they display antibacterial activities against both gram-negative and gram-positive bacteria (Nakamura and Hatanaka, 2002). In this sense, GLVs formed during the avirulent infection of beans against *Pseudomonas* were sufficient to be toxic to the pathogenic bacteria (Croft et al., 1993). In the present work, we have also observed antimicrobial properties for HA (Figure S1), although it appears to be insufficient to enhance resistance to *Pst*. Here, we describe an indirect defensive role of GLV esters in stomatal defense of plants against *Pst*.

We observed that tomato plants treated with HP or HB display a higher ratio of stomatal closure, PR gene induction and reduced symptom development following *Pst* inoculation. Moreover, *as-AAT1* tomato plants, which are impaired in the emission of these GLV esters upon bacterial infection, exhibited a lower ratio of stomatal closure and were hyper-susceptible to *Pst*. Similar results have been described with the precursors of these volatiles in *Arabidopsis* (Montillet et al., 2013). These authors demonstrated that treatments with LOX substrates (PUFAs), or with LOX products (fatty acid hydroperoxides; FAHs) trigger stomatal closure, and that the 9-lipoxygenase, *LOX1*, is required to trigger stomatal closure in response to bacteria in *Arabidopsis*. Related to this result, we observed that *Arabidopsis* plants treated with HB have a higher ratio of stomata closure (Figure 6B), consistent with a role for GLV esters affecting stomatal defense in *Arabidopsis* as well. It would be of great interest to study the possible PUFA-mediated emission of GLV esters, or the phenotype against bacteria of *Arabidopsis* mutants in 13-LOX gene, which is responsible for GLV ester biosynthesis.

GLVs have been reported to induce resistance against fungal pathogens. In this context, application of (*E*)-2-hexenal reduced the severity of powdery mildew in tobacco plants (Quaglia et al., 2012). Exogenous treatments with (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenal, or (*Z*)-3-hexenol induced expression of several defense genes and enhanced resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis* (Kishimoto et al., 2008). Also, transgenic tomato plants overexpressing a tea hydroperoxide lyase (*CsiHPL1*) release more constitutive and wound-induced GLVs, including (*Z*)-3-hexenal and (*Z*)-3-hexen-1-ol, and exhibit enhanced resistance to the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (Xin et al., 2014). Numerous examples of the role of GLVs in plant-fungal interactions have been reviewed (Scala et al., 2013). All these results, together with the work presented here clearly demonstrate the involvement of GLVs in the plant defense response. Furthermore, some species of fungi, such as *Puccinia* are specialized to enter the leaves only through stomata and several fungal metabolites that modulate stomatal behavior have been described (Shafiei et al., 2007; Grimmer et al., 2012; Murata et al., 2015). Therefore, GLVs may also play a role in stomatal defense against fungal pathogens.

Likewise, the regulation of stomatal aperture is known to be part of the plant immune response against bacteria. Two consecutive steps of stomatal movement upon infection with *Pst* in *Arabidopsis* (Melotto et al., 2006) and tomato (Du et al., 2014) have been described. Upon perception of the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), plants close stomata within 1 h in an ABA-dependent manner, thus limiting entry of the pathogen.

In a second phase, bacterial coronatine provokes a JA-dependent reopening of the stomata after 3–4 h. Here we observed that, as a consequence of recognition of the bacterial effectors, a third phase may occur so that the plant recloses the stomata in a SA-independent process. Analogous to the plant immune zig-zag model (Jones and Dangl, 2006), a stomatal defense zig-zag model can be proposed (Figure 7).

Broadening the effect of GLV esters on plants, we observed that HB treatments provoke stomatal closure in several plant species, belonging to Solanaceae, Leguminosae, Brassicaceae, Citrus, and Gramineae (Figure 6B) (Lisón et al., 2017). Stomatal aperture regulates not only the entry of pathogens, but also several important processes including CO₂ uptake for photosynthesis and loss of water by transpiration. It has been widely described that controlling stomatal closure can enhance plant resistance to drought (Cominelli et al., 2010). However, prolonged stomatal closure is not sustainable, since it limits photosynthetic assimilation and growth (Farquhar and Sharkey, 1982). We propose that application of HB may have utility in agriculture for punctuated periods to alleviate both biotic and abiotic stresses. Further studies will be necessary to better establish the HB uses.

Advances in the identification of genes and enzymes responsible for biosynthesis of volatile compounds have made possible the development of metabolic engineering, enabling improvement of different plant characteristics, including reproduction, the quality of the aroma of the fruits and defense against herbivores (Dudareva and Pichersky, 2008). Chemical communication between plants has also received much attention because of the role of the VOCs as possible inducers of defenses in host plants. In this respect,

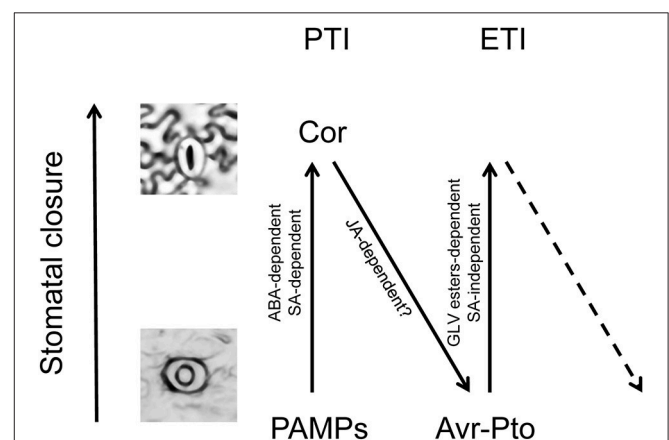


FIGURE 7 | Zig-zag model for stomatal defense. Analogously to the previously proposed zig-zag model for plant immunity (Jones and Dangl, 2006), three different phases are proposed for the stomatal defense. In phase 1, upon perception of the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), plants close stomata in an ABA-dependent manner, contributing to the PAMP-triggered immunity (PTI). In phase 2, bacterial coronatine provokes a JA-dependent reopening of the stomata, interfering with PTI. In phase 3, the bacterial effectors are recognized by NB-LRR proteins activating effector-triggered immunity (ETI), and then the plant recloses the stomata in a GLV-dependent and SA-independent process.

airborne signals from BTH-treated or infected plants can enhance the resistance of lima bean to a bacterial pathogen (Yi et al., 2009). Similarly, overexpressing β -ocimene synthase in tobacco plants results in higher emission of this monoterpene and induces resistance to herbivores in neighboring corn, lima beans and tomato plants (Muroi et al., 2011; Cascone et al., 2015). Moreover, antifungal volatiles released from Chinese chive help control Panama disease in banana (Zhang et al., 2013). Our results could lead to the use of metabolic engineering for improving the defense of plants against pathogens, by modifying GLV ester biosynthetic genes. The volatile nature of GLV esters would permit these transgenic plants to provide protection in non-transgenic neighboring crops.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PL and ML-G conceived and designed the study. ML-G, MO, and CP performed the experiments. CP and IR prepared the figures.

REFERENCES

- Aharoni, A., Giri, A. P., Deurlein, S., Griepink, F., de Kogel, W. J., Verstappen, F. W., et al. (2003). Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell* 15, 2866–2884. doi: 10.1105/tpc.016253
- Amey, M., Allmann, S., Verwaeren, J., Smagge, G., Haesaert, G., Schuurink, R. C., et al. (2018). Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis. *New Phytol.* 220, 666–683. doi: 10.1111/nph.14671
- Arnaud, D., and Hwang, I. (2015). A sophisticated network of signaling pathways regulates stomatal defenses to bacterial pathogens. *Mol. Plant* 8, 566–581. doi: 10.1016/j.molp.2014.10.012
- Brading, P. A., Hammond-Kosack, K. E., Parr, A., and Jones, J. D. (2000). Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant J.* 23, 305–318. doi: 10.1046/j.1365-3113x.2000.00778.x
- Campos, L., Granell, P., Tarraga, S., Lopez-Gresa, P., Conejero, V., Belles, J. M., et al. (2014). Salicylic acid and genticic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 77, 35–43. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.01.016
- Cardoza, Y. J., and Tumlinson, J. H. (2006). Compatible and incompatible Xanthomonas infections differentially affect herbivore-induced volatile emission by pepper plants. *J. Chem. Ecol.* 32, 1755–1768. doi: 10.1007/s10886-006-9107-y
- Cascone, P., Iodice, L., Maffei, M. E., Bossi, S., Arimura, G., and Guerrieri, E. (2015). Tobacco overexpressing beta-ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. *J. Plant Physiol.* 173, 28–32. doi: 10.1016/j.jplph.2014.08.011
- Cominelli, E., Galbiati, M., and Tonelli, C. (2010). Transcription factors controlling stomatal movements and drought tolerance. *Transcription* 1, 41–45. doi: 10.4161/trns.1.1.12064
- Croft, K. P. C., Juttner, F., and Slusarenko, A. J. (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with pseudomonas syringae pv phaseolicola. *Plant Physiol.* 101, 13–24.
- Dangl, J. L., and Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833. doi: 10.1038/35081161
- Drukker, B., Bruin, J., Jacobs, G., Kroon, A., and Sabelis, M. W. (2000). How predatory mites learn to cope with variability in volatile plant signals in the environment of their herbivorous prey. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 881–895. doi: 10.1023/A:1010645720829
- Du, M., Zhai, Q., Deng, L., Li, S., Li, H., Yan, L., et al. (2014). Closely related NAC transcription factors of tomato differentially regulate stomatal closure and reopening during pathogen attack. *Plant Cell* 26, 3167–3184. doi: 10.1105/tpc.114.128272
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., and Orlova, I. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25, 417–440. doi: 10.1080/07352680600899973
- Dudareva, N., and Pichersky, E. (2008). Metabolic engineering of plant volatiles. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 181–189. doi: 10.1016/j.copbio.2008.02.011
- Farquhar, G. D., and Sharkey, T. D. (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 317–345. doi: 10.1146/annurev.pp.33.060182.001533
- Gimenez-Ibanez, S., Boter, M., Ortigosa, A., Garcia-Casado, G., Chini, A., Lewsey, M. G., et al. (2017). JAZ2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytol.* 213, 1378–1392. doi: 10.1111/nph.14354
- González-Guzmán, M., Rodríguez, L., Lorenzo-Orts, L., Pons, C., Sarrion-Perdigones, A., Fernandez, M. A., et al. (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. *J. Exp. Bot.* 65, 4451–4464. doi: 10.1093/jxb/eru219
- González-Mas, M. C., Rambla, J. L., Alamar, M. C., Gutierrez, A., and Granell, A. (2011). Comparative analysis of the volatile fraction of fruit juice from different Citrus species. *PLoS ONE* 6:e22016. doi: 10.1371/journal.pone.0022016
- Goulet, C., Kamiyoshihara, Y., Lam, N. B., Richard, T., Taylor, M. G., Tieman, D. M., et al. (2015). Divergence in the enzymatic activities of a tomato and *Solanum pennellii* alcohol acyltransferase impacts fruit volatile ester composition. *Mol. plant* 8, 153–162. doi: 10.1016/j.molp.2014.11.007
- Grimmer, M. K., John Foulkes, M., and Paveley, N. D. (2012). Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. *J. Exp. Bot.* 63, 4321–4331. doi: 10.1093/jxb/ers143
- Hijaz, F., Nehela, Y., and Killiny, N. (2016). Possible role of plant volatiles in tolerance against huanglongbing in citrus. *Plant Signal Behav.* 11:e1138193. doi: 10.1080/15592324.2016.1138193
- Huang, J., Cardoza, Y. J., Schmelz, E. A., Raina, R., Engelberth, J., and Tumlinson, J. H. (2003). Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta* 217, 767–775. doi: 10.1007/s00425-003-1039-y
- Ishiga, Y., Ishiga, T., Uppalapati, S. R., and 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:e75728. doi: 10.1371/journal.pone.0075728
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Grant AICO/2017/048 from the Generalitat Valenciana and by Grant INNVAL10/18/005 from the Agència Valenciana de la Innovació (Spain). We would like to thank the Metabolomics Service of the IBMCP (Valencia, Spain), especially to Teresa Caballero for her excellent technical support in the VOCs quantification. We also thank Eduardo Moya for technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01855/full#supplementary-material>

- Kessler, A., and Baldwin, I. T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291, 2141–2144. doi: 10.1126/science.291.5511.2141
- Kim, J., and Felton, G. W. (2013). Priming of antiherbivore defensive responses in plants. *Insect. Sci.* 20, 273–285. doi: 10.1111/j.1744-7917.2012.01584.x
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., and Takabayashi, J. (2008). Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in Arabidopsis against *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 69, 2127–2132. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.04.023
- Lin, N. C., and Martin, G. B. (2005). An avrPto/avrPtoB mutant of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 does not elicit Pto-mediated resistance and is less virulent on tomato. *Mol. Plant Microbe Inter.* 18, 43–51. doi: 10.1094/mpmi-18-0043
- Lisón, P., Lopez-Gresa, M. P., Rodrigo, I., and Belles, J. M. (2017). *National Patent. Compuesto Para la Protección de Plantas Mediante Cierre Estomático, Uso, Composición y Método Relacionados*. P201730685. Spain patent application.
- Lisón, P., Rodrigo, I., and Conejero, V. (2006). A novel function for the cathepsin D inhibitor in tomato. *Plant Physiol.* 142, 1329–1339. doi: 10.1104/pp.106.086587
- López-Gresa, M. P., Lison, P., Campos, L., Rodrigo, I., Rambla, J. L., Granell, A., et al. (2017). A Non-targeted metabolomics approach unravels the VOCs associated with the tomato immune response against *Pseudomonas syringae*. *Front. Plant Sci.* 8:1188. doi: 10.3389/fpls.2017.01188
- Matsui, K. (2016). A portion of plant airborne communication is endorsed by uptake and metabolism of volatile organic compounds. *Curr. Opin. Plant Biol.* 32, 24–30. doi: 10.1016/j.pbi.2016.05.005
- Melotto, M., Underwood, W., and He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 101–122. doi: 10.1146/annurev.phyto.121107.104959
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969–980. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.054
- Montillet, J. L., Leonhardt, N., Mondy, S., Tranchimand, S., Rumeau, D., Boudsocq, M., et al. (2013). An abscisic acid-independent oxylipin pathway controls stomatal closure and immune defense in Arabidopsis. *PLoS Biol.* 11:e1001513. doi: 10.1371/journal.pbio.1001513
- Murata, Y., Mori, I. C., and Munemasa, S. (2015). Diverse stomatal signaling and the signal integration mechanism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 369–392. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114707
- Muroi, A., Ramadan, A., Nishihara, M., Yamamoto, M., Ozawa, R., Takabayashi, J., et al. (2011). The composite effect of transgenic plant volatiles for acquired immunity to herbivory caused by inter-plant communications. *PLoS ONE* 6:e24594. doi: 10.1371/journal.pone.0024594
- Nakamura, S., and Hatanaka, A. (2002). Green-leaf-derived C6-aro compounds with potent antibacterial action that act on both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7639–7644. doi: 10.1021/jf025808c
- Niinemets, U., Kaennaste, A., and Copolovici, L. (2013). Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Front. Plant Sci.* 4: 262. doi: 10.3389/fpls.2013.00262
- Ntoutkakias, V., Mucyn, T. S., Gimenez-Ibanez, S., Chapman, H. C., Gutierrez, J. R., Balmuth, A. L., et al. (2009). Host inhibition of a bacterial virulence effector triggers immunity to infection. *Science* 324, 784–787. doi: 10.1126/science.1169430
- Panchal, S., and Melotto, M. (2017). Stomate-based defense and environmental cues. *Plant Signal Behav.* 12:e1362517. doi: 10.1080/15592324.2017.1362517
- Quaglia, M., Fabrizi, M., Zizzerini, A., and Zadra, C. (2012). Role of pathogen-induced volatiles in the *Nicotiana tabacum-Golovinomyces cichoracearum* interaction. *Plant Physiol. Biochem.* 52, 9–20. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.11.006
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 317–343. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114447
- Rodrigo, I., Vera, P., Tornero, P., Hernandez-Yago, J., and Conejero, V. (1993). cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23. Characterization as a vacuolar antifungal factor. *Plant Physiol.* 102, 939–945.
- Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, A. M., and Schuurink, C. R. (2013). Green Leaf Volatiles: a plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 17781–17811. doi: 10.3390/ijms140917781
- Shafei, R., Hang, C., Kang, J. G., and Loake, G. J. (2007). Identification of loci controlling non-host disease resistance in Arabidopsis against the leaf rust pathogen *Puccinia triticina*. *Mol. Plant Pathol.* 8, 773–784. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00431.x
- Tornero, P., Rodrigo, I., Conejero, V., and Vera, P. (1993). Nucleotide sequence of a cDNA encoding a pathogenesis-related protein, P1-p14, from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiol.* 102:325.
- Xin, Z., Zhang, L., Zhang, Z., Chen, Z., and Sun, X. (2014). A tea hydroperoxide lyase gene, CsiHPL1, regulates tomato defense response against *Prodenia litura* (Fabricius) and *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* by modulating Green Leaf Volatiles (GLVs) release and Jasmonic Acid (JA) gene expression. *Plant Mol. Biol. Rep.* 32, 62–69. doi: 10.1007/s11105-013-0599-7
- Yi, H. S., Heil, M., Adame-Alvarez, R. M., Ballhorn, D. J., and Ryu, C. M. (2009). Airborne induction and priming of plant defenses against a bacterial pathogen. *Plant Physiol.* 151, 2152–2161. doi: 10.1104/pp.109.144782
- Zhang, H., Mallik, A., and Zeng, R. S. (2013). Control of Panama disease of banana by rotating and intercropping with Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler): role of plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* 39, 243–252. doi: 10.1007/s10886-013-0243-x
- Zheng, X. Y., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P. P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., et al. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* 11, 587–596. doi: 10.1016/j.chom.2012.04.014

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 López-Gresa, Payá, Ozáez, Rodrigo, Conejero, Klee, Bellés and Lisón. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.