



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Estudio del mecanismo de acción del cierre estomático mediado por butanoato de (Z)-3-hexenilo en plantas

Trabajo Fin de Master

Laura Yamila Rodríguez Chikri

Directoras:

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

Valencia, 2020

RESUMEN

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). En concreto, se ha identificado la emisión diferencial de ésteres de (Z)-3-hexenilo de plantas de tomate “Rio Grande” como consecuencia de la infección con la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (López-Gresa et al., 2017). 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 produce la inducción de proteínas y metabolitos defensivos, sino que también cierra los estomas, produciendo así un aumento de la resistencia frente a la infección bacteriana. Además, este cierre estomático mediado por HB no sólo fue observado en Solanáceas sino que también fue efectivo en varias especies de plantas pertenecientes al género *Nicotiana*, *Arabidopsis*, *Medicago*, *Zea* y *Citrus* (López-Gresa et al., 2018). Su gran eficacia y universalidad nos ha llevado a la obtención de una patente para dicho compuesto como inductor del cierre estomático (Lisón et al., 2017).

En el presente TFM se profundiza en el estudio de los mecanismos de acción del HB, así como su posible interacción con diferentes rutas de señalización hormonales y defensivas. Para ello, se estudia el efecto -en términos de cierre estomático y resistencia a la infección por *Pseudomonas syringae*- que producen tratamientos exógenos de HB sobre plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* y *Ler*, así como, sobre plantas mutantes que tienen alterados diferentes genes clave en las etapas tempranas de la señalización defensiva. También se comprueba la existencia de un posible efecto de los VOCs en la comunicación entre plantas. Todos estos estudios refuerzan la importancia de los VOCs como compuestos clave en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos.

Palabras clave: VOCs, butanoato de (Z)-3-hexenilo; estomas; *Arabidopsis thaliana* *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

ABSTRACT

In response to stress, plants synthesize different defense proteins and chemical compounds. Among others, volatile organic compounds (VOCs) belong to this group of defensive metabolites (Niinemets et al., 2013). Specifically, the differential emission of (Z)-3-hexenyl esters from “Rio Grande” tomato plants has been identified after the infection with the avirulent bacterium *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (López-Gresa et al., 2017). Among these esters, it is worth mentioning the (Z)-3-hexenyl butanoate (HB) which, after being applied directly on tomato plants, not only induces proteins and defensive metabolites, but also closes the stomata, thus producing an increase in resistance against bacterial infection. Furthermore, this HB-mediated stomatal closure was also effective in several plant species belonging to the genus *Nicotiana*, *Arabidopsis*, *Medicago*, *Zea* and *Citrus* (López-Gresa et al., 2018). Its efficacy and universality have led us to obtain a patent for this compound as an inducer of stomatal closure (Lisón et al., 2017).

This TFM has focused into the study of the mechanisms of action of HB, as well as its possible interaction with different hormonal and defensive signaling pathways. To this aim, the effect -in terms of stomatal closure and resistance to infection by *Pseudomonas syringae*- that produce exogenous HB treatments on *Arabidopsis thaliana* ecotype *Col-0* and *Ler* plants, as well as on mutant plants with different key genes altered in the early stages of defensive signaling, is studied. A possible effect of VOCs on communication between plants is also verified. All these studies reinforce the importance of VOCs as key compounds in the defensive response of plants against pathogens.

Key words: VOCs, (Z)-3-hexenyl butanoate (HB); stomata; *Arabidopsis thaliana* *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.

INDICE

1. Introducción	1
1.1. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i> DC3000 como organismo patógeno.	1
1.2. La respuesta defensiva de la planta frente a patógenos.	2
1.2.1. Inmunidad activada por PAMPs (PTI)	2
1.2.2. Inmunidad activada por efectores (ETI)	3
1.3. Componentes moleculares de la respuesta defensiva.	3
1.4. El mecanismo de cierre estomático en las plantas.	5
1.5. Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y su acción en la respuesta defensiva de la planta.	6
1.5.1. Los volátiles de hoja verde (<i>Green Leaf Volatiles</i> , GLVs)	7
1.5.2. Los VOCs y la comunicación entre plantas.	9
2. Objetivos.	11
3. Materiales y métodos.	12
3.1. Material vegetal.	12
3.2. Siembra y condiciones de cultivo.	12
3.2.1. Cultivo <i>in vivo</i> .	12
3.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> .	13
3.3. Tratamientos con butanoato de (Z)-3-hexenilo.	13
3.3.1. <i>In vivo</i> : tratamientos en cajas de metacrilato.	13
3.3.2. <i>In vitro</i> .	13
3.4. Material microbiológico, medios de cultivo, infección y conteo bacteriano.	13
3.4.1. Medios de cultivo	13
3.4.2. Preparación del inóculo bacteriano.	14
3.4.3. Infección bacteriana.	14
3.4.4. Conteo bacteriano.	15
3.5. Medidas de apertura estomática.	15
3.6. Medidas de la temperatura de las hojas.	15
3.7. Medidas de la anchura de roseta.	15
3.8. Medidas del peso de la parte aérea.	16
3.9. Diseño experimental y toma de muestra.	16
3.9.1. Rastreo de mutantes.	16

3.9.2.	Comunicación entre plantas.	16
3.9.3.	Experimentos de cultivo <i>in vitro</i>	17
3.10.	Análisis cuantitativo de transcritos mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR) .	18
3.10.1.	Extracción y cuantificación de RNA total.	18
3.10.2.	Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)	18
3.11.	Análisis estadísticos.	19
4.	Resultados y discusión.	20
4.1.	El HB induce el cierre estomático en <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
4.2.	El HB induce ciertas rutas de señalización defensivas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
4.3.	El HB inhibe el crecimiento en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo <i>Col-0</i>	23
4.4.	Inducción del cierre estomático y de la respuesta defensiva mediada por la comunicación entre plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
4.5.	Estudio de genes implicados en la señalización mediada por HB en <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
4.6.	Perspectivas futuras.	29
5.	Conclusiones.	31
6.	Bibliografía.	32

1. Introducción

1.1. *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000 como organismo patógeno

Las plantas son organismos sésiles susceptibles de ser atacadas por diversos organismos patógenos, entre los que se encuentran bacterias, hongos, virus, y otros. Este ataque causa en ellas el denominado estrés biótico, frente al cual responden activando diversos mecanismos de defensa.

Pseudomonas syringae (*Ps*) es una de las bacterias fitopatógenas que mejor se ha estudiado. Esta bacteria Gram-negativa es la causante de diversas enfermedades en una gran variedad de especies vegetales, provocando grandes pérdidas en los cultivos. Este patógeno hemibiotrófico de infección local, principalmente infecta la parte aérea de la planta como los frutos y las hojas. A lo largo de la infección, las cepas de *Ps* siguen un ciclo de dos etapas que, generalmente, están interconectadas espacio-temporalmente. Una fase inicial epifita, cuando el patógeno alcanza la superficie de la planta sana, y otra endofítica que tiene lugar en el espacio apoplástico, tras la entrada del patógeno en la planta a través de heridas y aberturas naturales, como los estomas (Melotto et al., 2008; Xin & He, 2013).

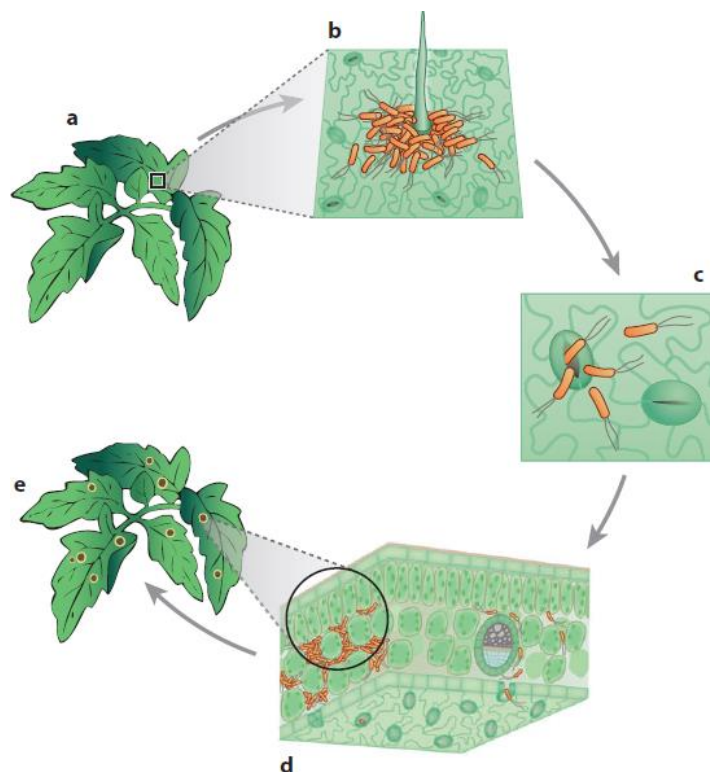


Figura 1.1. Ciclo de infección de *Pseudomonas syringae*. (a) Hoja sana. (b) Fase epifita, bacterias alrededor de un tricoma en la superficie de la hoja. (c) Bacterias penetrando a través de estomas abiertos. (d) Fase endofítica, bacterias colonizando y multiplicándose en el apoplasto de la hoja. (e) Hoja infectada con síntomas de clorosis y necrosis típicos de esta enfermedad (Xin & He, 2013).

La fase más agresiva de la multiplicación de *Ps* tiene lugar en ausencia de aparente muerte celular del huésped. Sin embargo, en la etapa tardía de la patogénesis, después de que las bacterias casi han alcanzado el pico de población en los tejidos infectados, las células

huésped mueren y los tejidos infectados muestran una necrosis extensa. Siendo este modo de patogénesis distinto del de los patógenos estrictamente biotróficos y de los patógenos estrictamente necrotrofos (Melotto et al., 2008; Xin et al., 2018).

El patovar DC3000 de *Ps* (*Pst* DC3000) es un patovar de tomate resistente a la rifampicina derivado de *Pst* DC52. Además de infectar a tomate, es capaz de infectar a *Arabidopsis thaliana*, lo cual ha facilitado el estudio del mecanismo molecular por el cual la bacteria causa la enfermedad, ya que *A.thaliana* es una especie modelo (Xin & He, 2013).

1.2. La respuesta defensiva de la planta frente a patógenos

Las plantas poseen mecanismos de defensa tanto pasivos como activos para hacer frente al ataque de patógenos. Las principales barreras de defensa pasiva o constitutiva que presentan son la cutícula cerosa de las hojas, la pared celular y la síntesis de metabolitos secundarios. Estos impedimentos, tanto físicos como químicos, representan la primera línea defensiva frente a la infección, y además de protegerlas del ataque de patógenos, les confieren fuerza y rigidez.

Sin embargo, existen patógenos, como *Ps*, capaces de vencer esta primera línea de defensa. En estos casos las plantas activan una segunda respuesta defensiva de tipo inducible, denominada inmunidad activada, con el fin de restringir la proliferación de éstos. Esta respuesta se basa en el reconocimiento de inductores patogénicos y consta de dos niveles o vías de señalización inmune según el tipo de reconocimiento: la inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) conocida como PTI (*PAMP Triggered Immunity*), y la ETI (*Effector-Triggered Immunity*) o inmunidad activada por efectores (Jones & Dangl, 2006).

1.2.1. Inmunidad activada por PAMPs (PTI)

Como ya se ha descrito, esta primera respuesta se basa en el reconocimiento extracelular de un gran número de moléculas elicitoras, denominadas PAMPs, a través de receptores de membrana plasmática, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones o PRRs. La activación de los PRRs por PAMPs induce una serie de respuestas celulares que resultan en una inmunidad funcional denominada PTI (Jones & Dangl, 2006).

Las plantas son capaces de reconocer un gran número de PAMPs, entre los que destacan la flagelina y el factor de elongación Tu (Ef-Tu). La flagelina, es la proteína encargada de la motilidad del flagelo en las bacterias y es reconocida en *Arabidopsis thaliana* por el receptor PRR de membrana FLS2 (*flagellin-sensitive 2*). EF-Tu es otro de los elicitors mejor conservado en las bacterias, se trata de una proteína implicada en la traducción que es reconocida por EFR (*ELONGATION FACTOR Tu RECEPTOR*) (Gimenez-Ibanez & Rathjen, 2010) en *Arabidopsis*.

Sin embargo, la percepción de los PAMPs no es ubicua entre las distintas especies de plantas, es probable que la capacidad para reconocer PAMP particulares esté determinada por los patógenos a los que están expuestos.

Una vez que estos PAMPs son reconocidos por los PRR se activan diversas cascadas de fosforilación de MAP quinasas (*Mitogen-activated protein kinases*, MAPKs), lo que se traduce en la activación de diferentes factores de transcripción. Esto desencadena un conjunto de respuestas defensivas específicas, que tienen como fin hacer frente al patógeno, como son la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la deposición de callosa, la síntesis de lignina, la generación de mensajeros secundarios o la síntesis de proteínas de defensa PRs (*Pathogenesis-Related Proteins*) (Gimenez-Ibanez & Rathjen, 2010; Jones & Dangl, 2006).

Con el fin de modular y dirigir la respuesta defensiva, la señalización hormonal mediada por el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA), el ácido abscísico (ABA) o el etileno (ET) juega un papel esencial.

1.2.2. Inmunidad activada por efectores (ETI)

La respuesta ETI se basa en el reconocimiento de efectores de virulencia secretados por los patógenos con el fin de suprimir las respuestas defensivas de la planta. En el caso de la bacteria Ps, la secreción de efectores tiene lugar a través del sistema de secreción tipo III, codificado por los genes *hrp* (*hipersensitive response and pathogenic*). Estos efectores se conocen como factores de avirulencia (Avr) y la evolución ha permitido a las plantas reconocerlos mediante la síntesis de productos codificados por los genes de resistencia R. A este modelo de interacción entre el factor Avr de la bacteria y el factor codificado por el gen R, de la planta, se le denomina interacción gen-a-gen, y conlleva una respuesta de tipo incompatible.

Por el contrario, si no se produce el adecuado reconocimiento de los efectores, tiene lugar una interacción compatible, provocando infección sistémica y el consiguiente desarrollo de la enfermedad, que puede incluso desencadenar la muerte de la planta.

La activación de la ETI, a causa de la interacción incompatible, desencadena cascadas de señalización y otra serie de respuestas, como el estallido oxidativo, que provocan la muerte celular programada del tejido invadido y tienen como fin frenar la expansión y colonización del patógeno, lo cual constituye la llamada respuesta hipersensible (HR). Además, se produce una segunda respuesta de larga duración, la resistencia sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) con el fin de proteger a la planta del ataque futuro de patógenos. En ella destaca el aumento en la síntesis de ácido salicílico que favorece la señalización a otras partes de la planta y conduce a la expresión de genes de defensa y a la síntesis de proteínas PR (Gimenez-Ibanez & Rathjen, 2010; Jones, J.D.G., 2006).

1.3. Componentes moleculares de la respuesta defensiva

Como se ha mencionado anteriormente, cuando las plantas son atacadas por patógenos, los PRR reconocen a los PAMPs y desencadenan cascadas de fosforilación de MAP quinasas. Entre estos PRR destacan FLS2 y EFR, los cuales forman heterodímeros con BAK1 (*BR1-associated receptor kinase 1*), un miembro de la subfamilia SERK (*somatic embryogenesis*

receptor kinase) de proteínas quinasas receptoras (*receptor-like protein kinases*, RLKs) (Li et al., 2002; Postel et al., 2010; Shang et al., 2020). BAK1, también denominado SERK3, está, a su vez, asociado con el receptor de brassinosteroides BRI1, formando un complejo dependiente de ligando y actuando como un regulador positivo en la respuesta a brassinosteroides (BR) (Li et al., 2002; Postel et al., 2010). Por tanto, actúa como un co-receptor dual de BRI1 y FLS2-EFR mediando tanto en la señalización de BR, como en la inmunidad activada por PAMPs (Kim et al., 2013).

Cuando el complejo FLS2-EFR-BAK1 es activado en respuesta a los PAMPs, este fosforila a BIK1, una proteína quinasa citoplasmática que es necesaria para activar la respuesta PTI y desencadenar las cascadas de MAPK. En la actualidad, todavía se desconocen los componentes que unen los complejos de receptores y dichas cascadas. En *Arabidopsis thaliana* existen dos cascadas activadas en respuesta a la percepción de flagelina. En la primera cascada, aguas abajo de FLS2-EFR, están implicadas una MAPKKK aún desconocida, dos MAPKK redundantes (MKK4/MKK5) y dos MAPK parcialmente redundantes (MPK3/MPK6). La segunda cascada de MAPK se compone de MEKK1, MKK1/MKK2 (dos MAPKK redundantes) y MPK4. La cascada MPK3 / MPK6 actúa como un regulador positivo de las respuestas de defensa. Inicialmente, se pensaba que la cascada MPK4 regulaba negativamente la inmunidad de las plantas porque los mutantes de la misma mostraban respuestas de defensa constitutivas y, eran más resistentes a los patógenos. Sin embargo, recientemente se ha visto que esta cascada regula positivamente la defensa basal. A través de la fosforilación de proteínas diana, incluidos factores de transcripción y enzimas, las MAPK controlan la síntesis y/o señalización de hormonas de defensa, la activación de genes de defensa, la síntesis de metabolitos antimicrobianos, la respuesta hipersensible (HR) y el cierre estomático (Meng & Zhang, 2013) (Figura 2).

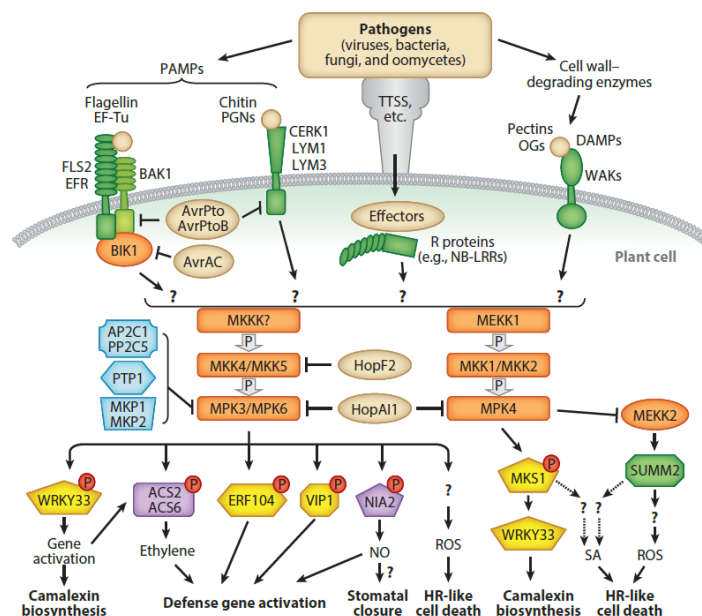


Figura 1.2. Cascada de señalización producida en la célula tras el reconocimiento de un patógeno. Se muestra la cascada de señalización activada en la célula vegetal en respuesta al ataque de patógenos. Dichos patógenos producen PAMPs y/o DAMPs que son reconocidos por diversos receptores de la célula vegetal.

Este reconocimiento se traduce en la activación de una serie de MAP quinasas a través de su fosforilación, lo que da lugar a una serie de respuestas como la activación de genes de defensa, el cierre estomático o la muerte celular programada (Meng & Zhang, 2013).

A continuación, profundizaremos en el proceso de cierre estomático y su implicación en la respuesta de defensa de la planta.

1.4. El mecanismo de cierre estomático en las plantas

Los estomas son poros microscópicos situados en la epidermis de los órganos aéreos de las plantas, que aseguran los intercambios gaseosos de CO₂ y vapor de agua, ambos requeridos para el proceso de fotosíntesis y el mantenimiento de la homeostasis. Las plantas controlan su apertura regulando la presión osmótica de las dos células guarda que flanquean a dicho poro, siendo el ácido abscísico la hormona con mayor implicación en esta regulación. Existen otros factores externos de los cuales depende la apertura y cierre del estoma como son la luz, la sequía, la humedad o la concentración de CO₂ (Joshi-Saha et al., 2011; Montillet & Hirt, 2013).

Además, se ha descrito que los estomas están implicados en las primeras fases de la inmunidad innata para prevenir, activamente, la entrada de patógenos como *Pseudomonas syringae* en las hojas (Melotto et al., 2006, 2008). Como ya se ha descrito, la bacteria *Pst* DC3000 es capaz de infectar la planta penetrando en ella a través de los estomas, en consecuencia se ha observado que la planta detecta los elicitores patogénicos, activa su defensa estomática, cierra los estomas y limita la entrada de dicho patógeno (Melotto et al., 2006).

En este proceso están implicadas el ABA y el SA, ambas hormonas actúan como reguladores positivos en el mecanismo de cierre estomático. De forma que, cuando un patógeno es reconocido por las células guarda de la planta se activa la cascada de MPK3/MPK6, descrita anteriormente, esto induce la activación de la enzima lipooxigenasa (LOX1). Dicha enzima cataliza la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en hidroperóxidos de ácidos grasos y oxilipinas, ambos potentes inductores del cierre estomático, y es necesaria para la activación del canal aniónico SLAC1 implicado en el cierre estomático (Figura 3). En la vía mediada por ABA los receptores PYR/PYL/RCAR (*PYRABACTIN RESISTANCE/PYRABACTIN-LIKE/REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR*), en presencia de esta hormona, secuestran a las proteínas fosfatasa 2C (PP2Cs) (Montillet & Hirt, 2013) que actúan como reguladores negativos en el proceso de cierre estomático, entre estas fosfatasas encontramos por ejemplo a ABI1 y ABI2 (*ABA INSENSITIVE 1* y 2) (Joshi-Saha et al., 2011). Como consecuencia queda libre la forma activa de la proteína quinasa OST1 (*OPEN STOMATA 1*), induciendo la producción de ROS y activando otra cascada de MAPK que, finalmente, conlleva a la activación de SLAC1 y al cierre del estoma. Por otro lado, la coronatina (COR) producida por patógenos como *Pseudomonas* se une al receptor vegetal COI1 (*CORONATINE INSENSITIVE 1*) y contribuye a la reapertura estomática a través de factores de transcripción de tipo NAC, que reprimen, indirectamente, la activación de SLAC1 (Figura 3) (Montillet & Hirt, 2013).

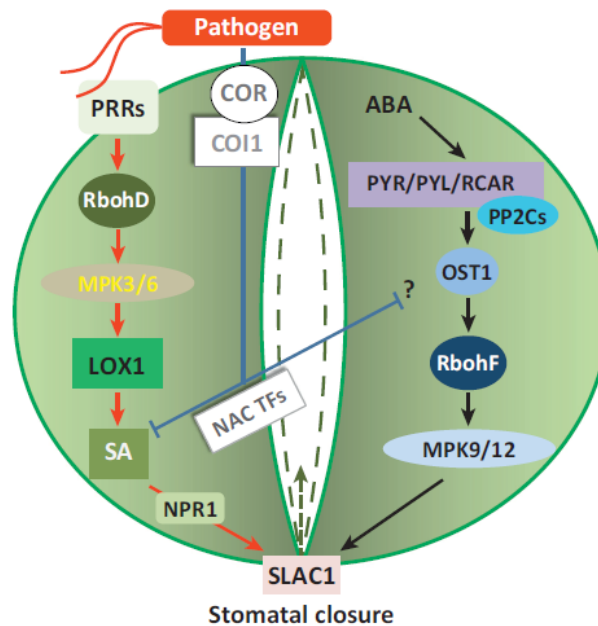


Figura 1.3 Regulación del cierre estomático tras el reconocimiento de un patógeno. Se representa la regulación del cierre estomático en respuesta al ataque de patógenos, en la cual están implicadas dos hormonas, el ácido salicílico (SA) y el ácido abscísico (ABA). La fosforilación de dos cascadas MAP quininas (MPK3/6 y MPK9/12) se traduce en la activación del canal aniónico SLAC1 implicado en el cierre estomático. PRRs (Receptores de reconocimiento de patrones), RbohD (NADPH /proteína D oxidasa de explosión respiratoria), RbohF (proteína F oxidasa de explosión respiratoria), NPR1 (*NONEXPRESOR of PR GENES1*) NAC TFs (Factores de transcripción de tipo NAC)(Montillet & Hirt, 2013).

1.5. Los compuestos orgánicos volátiles y su acción en la respuesta defensiva de la planta

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son metabolitos secundarios de naturaleza lipófila con alta presión de vapor y bajo peso molecular. Dichas características físico-químicas favorecen su liberación al medio externo, ya que les permiten atravesar con facilidad las membranas celulares (Pichersky et al., 2006). Los VOCs son sintetizados por las plantas con el fin de facilitar sus interacciones con el medio ambiente, se conoce que están implicados en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas, en la respuesta frente a estreses abióticos, como la sequía o la salinidad, así como, en la respuesta frente a estreses bióticos, como la defensa frente a herbívoros o patógenos (Dudareva et al., 2006).

La síntesis de la mayoría de los VOCs parte de ciertos precursores del metabolismo primario, comprendiendo cuatro rutas biosintéticas: la vía mevalónica (MVA), la vía del metileritritol (MEP), la ruta del shikimato y la ruta de las lipooxigenasas (LOX). Por tanto, los VOCs se pueden clasificar según su origen biosintético en: terpenoides si derivan de las rutas MVA y MEP, fenilpropanoides/bencenoides si derivan de la ruta del shikimato, volátiles de hoja verde (Green Leaf Volatiles, GLVs) y metil jasmonato si derivan de la ruta LOX (Figura 2) (Dudareva et al., 2013).

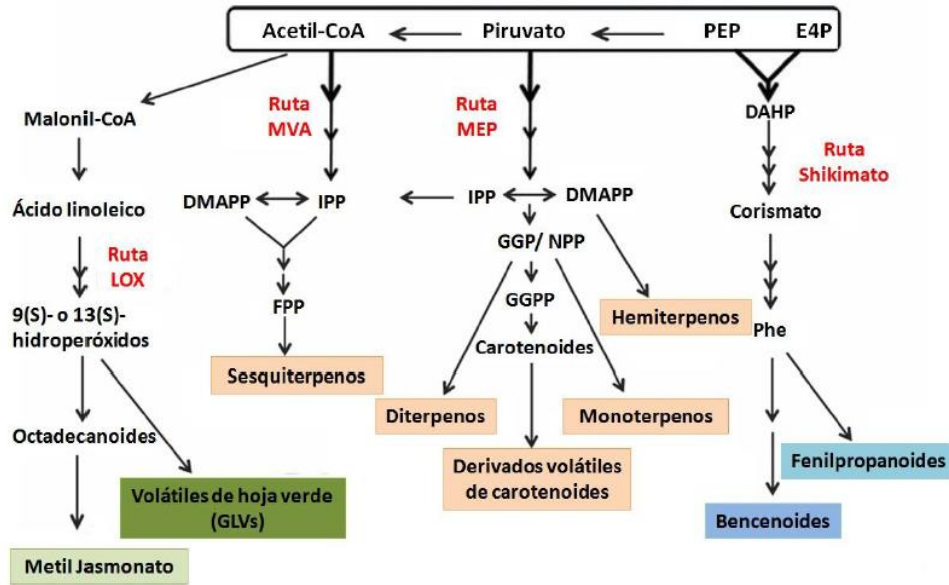


Figura 1.4. Esquema de las rutas biosintéticas de los VOCs. En el recuadro superior se representan los precursores del metabolismo primario, a partir de los cuales derivan las 4 rutas biosintéticas descritas que dan lugar a la emisión de los diferentes VOCs. DAHP, 3-desoxi-D-arabinoheptulosa-7-fosfato; DMAPP, pirofosfato de dimetilalilo; E4P, eritrosa 4-fosfato; FPP, pirofosfato de farnesilo; GGPP, geranylgeranyl pirofosfato; GPP, geranyl pirofosfato; IPP, pirofosfato de isopentenilo; NPP, neril pirofosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; Phe, fenilalanina (adaptado de Dudareva et al., 2013).

Dado que en este trabajo nos centramos en el estudio del mecanismo de acción del cierre estomático mediado por butanoato de Z-(3)-hexenilo (HB) que es un GLV, vamos a profundizar un poco más en ellos.

1.5.1. Los volátiles de hoja verde (Green Leaf Volatiles, GLVs)

Los GLVs son aldehídos y/o alcoholes de 6 átomos de carbono, y sus respectivos ésteres, cuya síntesis tiene lugar a partir de los ácidos grasos linoleico y linolénico. Por acción de las lipasas, dichos ácidos entran en la ruta de las oxilipinas y pasan a ser sustratos de las enzimas lipoxigenasas. Estas enzimas se clasifican según la posición del carbono sobre el cual actúan, por ejemplo, las 9-LOX actúan sobre el carbono 9 (C9) y las 13-LOX sobre el C13. En el caso de los GLVs, las enzimas implicadas son las 13-LOX dando lugar a 13-hidroperóxidos que, posteriormente por acción de la enzima hidroperóxido liasa (HPL), se escindirán, obteniéndose así los aldehídos de 6 átomos de carbono hexanal y (Z)-3-hexenal (Dudareva et al., 2013; Scala, Allmann, et al., 2013; ul Hassan et al., 2015). En el caso de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) se ha descrito la existencia de una delección de 10 nucleótidos en la región codificante del gen HPL, que da lugar a una enzima HPL truncada y sin actividad catalítica, impidiendo, por tanto, la producción de GLVs (Duan et al., 2005). Sin embargo, en otros ecotipos como *Landsberg erecta* (Ler) esto no ocurre, ya que poseen una copia funcional del gen HPL y sí son capaces de sintetizar GLVs (Duan et al., 2005).

Una vez formados los distintos aldehídos y por acción de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y la alcohol aciltransferasa (ATT), se forman los correspondientes alcoholes y ésteres. En concreto a partir del (Z)-3-hexenal, por acción de la ADH, se

obtiene el (Z)-3-hexenol, posteriormente, la enzima AAT se encarga de la esterificación con el ácido butírico dando lugar al butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) (Dudareva et al., 2013; Pichersky et al., 2006; ul Hassan et al., 2015).

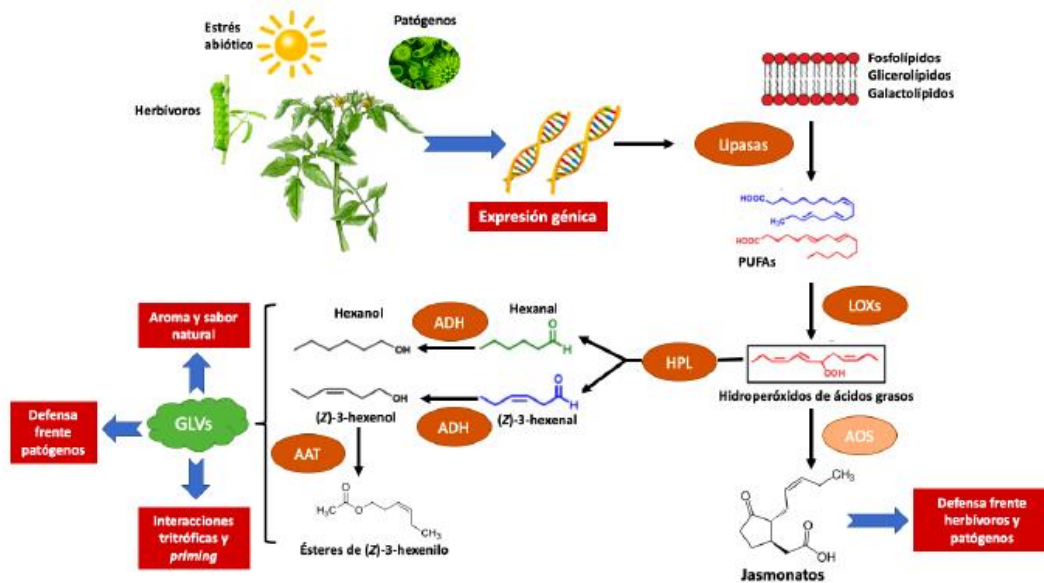


Figura 1.5. Biosíntesis de GLVs. Una vez los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs; ácido linoleico y linoleico), precursores de la síntesis de VOCs, entran en la ruta de las lipoxigenasas (LOXs), actúan una serie de enzimas como la hidropéroxido liasa (HPL), alcohol deshidrogenasa (ADH) y alcohol aciltransferasa (AAT) para dar lugar a la formación de GLVs (adaptado de ul Hassan et al., 2015).

Los GLVs cumplen distintas funciones en la respuesta defensiva de la planta, tanto frente a estreses abióticos como bióticos (ul Hassan et al., 2015). Respecto al estrés biótico se ha estudiado que estos compuestos son emitidos por las plantas en respuesta al ataque de herbívoros y patógenos, pudiendo actuar de forma directa, dañándolos, o indirecta, activando el sistema defensivo de las plantas en forma de elicitores (Niinemets et al., 2013).

La mayoría de estudios se centran en la respuesta defensiva frente a herbívoros, dejando en segundo plano la respuesta frente a patógenos, sin embargo, se ha observado que ciertos GLVs son emitidos tras la infección por hongos o bacterias (Ameye et al., 2018; Scala, Mirabella, et al., 2013). En el caso de los hongos, se conocen ejemplos de plantas como *Zea Mays* o *Arabidopsis thaliana* que emiten GLVs cuando son infectadas por *Fusarium spp* y *Botrytis cinerea*, respectivamente (Scala, Allmann, et al., 2013). De igual manera ocurre con las bacterias, por ejemplo, se ha comprobado que tras la infección con la bacteria patógena *Pseudomonas syringae pv. Phaseolicola*, las hojas de la judía liberan *E*-2-hexenal y *Z*-3-hexenol (Croft et al., 1993; Scala, Allmann, et al., 2013), por otro lado, cuando *Nicotiana tabaccum* es infectada por *Pseudomonas syringae pv. syringae* emite *E*-2-hexenal (Heiden et al., 2003; Scala, Allmann, et al., 2013); además, se ha demostrado que este y otros compuestos también son liberados por *Arabidopsis thaliana* (Scala, Allmann, et al., 2013; Scala, Mirabella, et al., 2013).

En nuestro laboratorio, se llevó a cabo el análisis metabolómico diferencial dirigido a VOCs de la respuesta defensiva de hojas de plantas de tomate ‘Rio Grande’ Pto infectadas con las dos cepas de la bacteria *Pst DC3000* portadoras o no del gen *AvrPto*. La comparación de los perfiles metabolómicos entre ambos tipos de infección desveló una serie de GLVs que se emitían de forma diferencial en cada interacción. En concreto, se observó que la activación de ETI en la planta 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) y butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) (López-Gresa et al., 2017). Asimismo, demostramos que estos GLVs juegan un papel fundamental en la defensa mediada por el cierre estomático de plantas de tomate frente a *Ps*, puesto que plantas de tomate tratadas con HB aumentaron la resistencia a *Ps* y plantas transgénicas antisentido *AATI*, que emiten menor cantidad de GLVs, resultaron ser más susceptibles a la bacteria. Por otra parte, comprobamos que el compuesto HB resulta también eficaz en otras especies vegetales, tales como *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Zea mays* y *Citrus x jambhiri*, demostrando así la universalidad del efecto del HB sobre el cierre de los estomas (López-Gresa et al., 2018). Dicho compuesto ha sido patentado y licenciado por una empresa por la gran cantidad de posibles usos en agricultura (Lisón et al., 2017; Payá et al., 2020), por lo que el estudio de su modo de acción resulta de gran interés.

1.5.2. Los VOCs y la comunicación entre plantas

La emisión de estos volátiles, causada por el ataque de herbívoros o patógenos, puede ser percibida por plantas vecinas, las cuales sufren un efecto de “*priming*”. El *priming* consiste en un proceso de preparación de la planta frente a futuros ataques, de forma que sea capaz de activar sus defensas inducibles más rápidamente y con más fuerza (Frost et al., 2008; Scala, Allmann, et al., 2013). El *priming* normalmente desencadena en la planta la antes mencionada SAR o resistencia sistémica adquirida, que conduce a un aumento en la síntesis de SA, así como a la expresión de genes de defensa y la síntesis de proteínas PR (Scala, Allmann, et al., 2013).

Varios estudios han demostrado que los VOCs como el metil jasmonato (MeJA), el metil salicilato (MeSA), los terpenoides o los GLVs actúan como moléculas señales en la comunicación planta-planta e intervienen en la inducción del *priming* (Das et al., 2013; Gómez et al., 2020). Por ejemplo, se ha descrito que plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la β -ocimeno sintasa son capaces de emitir una mayor cantidad de dicho monoterpeno e inducir resistencia a herbívoros en plantas vecinas de maíz, judías de Lima y tomate (Cascone et al., 2015; Muroi et al., 2011). Por otra parte, plantas transgénicas de tabaco que silencian genes que participan en la síntesis de GLVs son incapaces de emitir este tipo de compuestos y, por lo tanto, no inducen defensas frente a insectos en las plantas vecinas (Paschold et al., 2006). Además se ha descrito que los VOCs emitidos por plantas tratadas con BTH (butilhidroxitolueno) pueden inducir la resistencia de judías de Lima a bacterias (Yi et al., 2009) y que los VOCs emitidos por variedades resistentes de uva protegen frente a mildiu (una enfermedad de la vid) a tejidos receptores de dichos volátiles (Lazazzara et al., 2018). Otro ejemplo de *priming* se ha descrito en plantas de *Arabidopsis*

thaliana en respuesta al ataque de la bacteria *Pseudomonas syringae*, se observó que plantas infectadas con esta bacteria emiten monoterpenos volátiles como el α -pineno, β -pineno o el canfeno a causa de la activación de la SAR (Wenig et al., 2019). Estos compuestos son percibidos por las plantas vecinas activando también en ellas la SAR e induciendo la emisión de dichos monoterpenos, así como, de genes de defensa como PR1 (Wenig et al., 2019).

Por tanto, los volátiles juegan un importante papel en la comunicación entre plantas, no sólo en procesos relacionados con la respuesta defensiva, sino también en otros procesos que precisan de esta interacción con el medio externo.

2. Objetivos

En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio se identificaron diferentes esteres del (Z)-3-hexenol que son emitidos por las plantas de tomate cuando resisten a la infección con *Pst* DC3000, entre los que destaca el ya mencionado HB. Además, se demostró que tratamientos exógenos con HB producen la inducción del cierre estomático y de proteínas y metabolitos defensivos, aumentando así la resistencia frente a dicha bacteria.

En este trabajo se pretende profundizar en el mecanismo de acción del butanoato de (Z)-3-hexenilo, empleando para ello la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Para ello, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio del cierre estomático mediado por HB en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* y *Ler*.
2. Estudio de la activación producida por tratamientos con HB de las diferentes rutas de señalización hormonal relacionadas con la respuesta defensiva, como las mediadas por del ácido jasmónico, el ácido salicílico o el etileno, en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* y *Ler*.
3. Estudio del efecto del HB sobre el crecimiento *in vitro* de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* y *Ler*.
4. Estudio del cierre estomático y de la respuesta defensiva mediados por la comunicación entre plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Ler* infectadas con *Pst* DC3000 y sus vecinas.
5. Estudio del cierre estomático y de la resistencia frente a la infección de *Pst* DC3000 mediados por el HB en plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0*.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

Para la realización de este trabajo se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Columbia-0* (*Col-0*) de la línea silvestre (WT), así como de diferentes líneas mutantes (Tabla 1), y plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Landsberg erecta* (*Ler*). Las semillas de las líneas mutantes fueron amablemente cedidas por la Dra. Lucía Jordá Miro (Centro de Investigación en Biotecnología y Genómica de Plantas CBGP, Madrid).

Mutante	Codigo AGU	Características	Referencia
<i>bak1-3</i>	AT4G33430	Mutante afectado en la proteína quinasa, rica en leucina BAK1, que actúa como receptor implicado en la ruta de señalización de Brassinosteroides.	(Postel et al., 2010; Shan et al., 2008)
<i>bak1-5</i>	AT4G33430	Mutante afectado en el décimo exón del gen que codifica a BAK1.	(Schwessinger et al., 2011)
<i>mpk6</i>	AT2G43790	Mutante afectado en MPK6, una MAPK inducida por patógenos e implicada en la regulación estomática	(Meng & Zhang, 2013; Su et al., 2017)
<i>prp6</i>	AT2G13800.1	Mutante afectado en el gen que codifica a BAK8 también denominado SERK5, otra proteína quinasa rica en leucina con dominios LRR extracelulares, un único dominio transmembrana y un dominio quinasa citosólico	(Dressano et al., 2017)
<i>abi1-1</i>	AT4G26080	Mutante afectado en una proteína fosfatasa de tipo 2C, insensible al ácido abscísico, que actúa como regulador negativo en la inducción del cierre estomático mediado por ABA.	(Finkelstein et al., 1990; Leymarie et al., 1998)

Tabla 1: Mutantes de *Arabidopsis thaliana* en fondo *Col-0*.

3.2. Siembra y condiciones de cultivo

3.2.1. Cultivo *in vivo*

Las semillas se dejaron estratificar, en tubos eppendorf que contenían 2 mL de agua destilada, durante 3 días en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 4°C. A los 3 días, se sembraron en jiffys de 41 mm empleando una pipeta. Una vez sembradas se cubrieron con film transparente y se dejaron en una cabina de cultivo *in vitro* con fotoperiodo de ciclo corto (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad) a una temperatura que oscilaba entre 19-23°C y una humedad relativa del 50-70%. A los 4 días, cuando ya se observaban atisbos de germinación, se realizaron pequeños agujeros en el papel de film y, transcurridos otros 3 días, se retiró completamente. Al cabo de 14 días, se procedió a aclarar las bandejas, retirando con ayuda de unas pinzas las plantas sobrantes, con el fin de dejar una única planta por jiffy. Una vez aclaradas, se dejaron crecer durante unas 6

semanas en la cámara de cultivo mencionada anteriormente, y se regaron manualmente con solución de Hoagland.

3.2.2. Cultivo *in vitro*

Las semillas se esterilizaron en un tubo eppendorf aplicándoles una solución compuesta de etanol al 70% y tritón al 0.1% durante 10 minutos en agitación continua, una vez transcurrido el tiempo, se transfirieron a otro eppendorf que contenía una solución de etanol al 96% y se mantuvieron en agitación durante otros 10 minutos. Posteriormente, se dejaron secar en un papel de filtro estéril y se procedió a la siembra. La siembra se realizó en placas Petri que contenían medio Murashige y Skoog (MS) (descrito en la tabla 2) suplementado con diferentes concentraciones de HB (indicadas en el siguiente apartado). Luego, se dejaron germinar y crecer en cámaras de germinación, con una humedad relativa del 50/60% y un fotoperiodo de ciclo corto, a una temperatura que oscilaba entre los 19-23°C.

Medio	Compuesto	Cantidad
MS	MS	2.2 g
	Sacarosa	5 g
	Phyto Agar	6 g
	H ₂ O destilada / Ajustar a pH 5.6	Hasta 1L

Tabla 2: Composición y preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog

3.3. Tratamientos con butanoato de (Z)-3-hexenilo

3.3.1. *In vivo*: Tratamientos en cajas de metacrilato

Al cabo de 6 semanas, las plantas de *Arabidopsis thaliana*, fueron tratadas con HB en el interior de cajas de metacrilato de un volumen de 110L. Para ello, en un algodóncillo hidrofílico se aplicó el volumen de HB correspondiente a una concentración de 5µM; para las plantas control se empleó la misma cantidad de agua destilada. A continuación, las cajas se sellaron durante 24 horas, lo cual aseguró una atmósfera cerrada y uniforme.

3.3.2. *In vitro*

Para los experimentos en placa el medio MS fue suplementado con concentraciones de HB de 50 µM y 100 µM, dando 2 tratamientos diferentes. El volumen de HB correspondiente a cada concentración se aplicó después de que el medio fuera esterilizado, y se repartió en las placas donde posteriormente se sembraron las semillas. Todo el proceso se realizó en la cabina de flujo laminar. Como controles positivos se emplearon plantas sembradas en medio MS suplementado con metil-jasmonato a una concentración de 50 µM y como controles negativos plantas sembradas en medio MS sin suplementar.

3.4. Material microbiológico, medios de cultivo, infección y conteo bacteriano

La bacteria empleada para infectar las plantas fue *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000 (*Pst* DC3000).

3.4.1. Medios de cultivo

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

Medio	Compuesto	Cantidad
LB agar	LB agar (Pronadisa)	35 g
	H ₂ O destilada / Ajustar a pH	Hasta 1L
	Kanamicina (100 mg/mL)	0.5 mL
	Rifampicina (10 mg/mL)	10 mL
King B líquido	Proteasa peptona	10 g
	K ₂ HPO ₄	1.5 g
	Glicerol	15 g
	H ₂ O destilada / ajustar a pH 7	Hasta 1L
	MgSO ₄ 1 M estéril	5 mL
	Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL
King B agar	King B Agar (King B Medium Pseudomonas F Agar USP) (Pronadisa)	15 g
	Glicerol	10 g
	H ₂ O destilada / ajustar a pH 7	Hasta 1L
	Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL

Tabla 3: Composición y preparación de los medios de cultivo empleados para la infección y el conteo bacteriano

Todos los medios fueron esterilizados en un autoclave a 121°C durante 20 minutos, siempre antes de añadirles los antibióticos.

3.4.2. Preparación del inóculo bacteriano

La bacteria se cultivó, durante 48 horas a 28°C, en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio LB agar.

Cuando se obtuvo un número de colonias razonable, estas se sembraron en un tubo falcon con 3 mL de medio King B líquido, dejándolas crecer a 28°C en agitación. Transcurridas 24 horas se transfirió el cultivo bacteriano a un nuevo tubo falcon con 15 mL de King B líquido, con el fin de aumentar el número de colonias, bajo las mismas condiciones que el paso anterior.

A las 24 horas, el cultivo bacteriano obtenido se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm, luego se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 20 mL de MgCl₂ 10 mM estéril. Empleando un espectrofotómetro se midió la absorbancia del cultivo bacteriano a 600 nm, entonces se diluyó con MgCl₂ 10 mM estéril hasta obtener un inóculo con una densidad óptica de 0,2 nm. Por último, a este inóculo se le añadió el 0,05% de detergente Silwet L-77.

3.4.3. Infección bacteriana

El proceso de infección se realizó por spray, tanto en las plantas previamente tratadas con HB como en las plantas no tratadas, pulverizando el inóculo en el envés de las hojas. Una vez infectadas se cubrieron con film transparente y se mantuvieron durante 3 días en el

invernadero, a una temperatura de entre 18-25°C y un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad).

3.4.4. Conteo bacteriano

El conteo bacteriano se realizó a los 3 días de infección, para ello se tomaron 4 discos foliares de cada planta, de 0,85 cm de diámetro cada uno, con ayuda de un sacabocados, empleándose, al menos, 3 plantas diferentes por tratamiento. Dichos discos se sumergieron en una solución de MgCl₂ 10 mM y se trituraron en el homogeneizador TissueLyser II (Qiagen). Entonces se realizaron diluciones seriadas 1:10 del material infectado y homogeneizado, y se sembraron 3 gotas por dilución, de 20 µL cada una, en placas que contenían King B agar. Las placas se dejaron incubar a 28°C durante 24 horas y, transcurrido ese tiempo, se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias (CFU) con ayuda de un contador de colonias (Selecta; Vidrafoc).

3.5. Medidas de apertura estomática

Para medir la apertura de los estomas se obtuvieron moldes del envés de las hojas, esto se realizó aplicando una capa fina de laca de uñas transparente en la cara abaxial de las mismas, una vez seca, se retiró con ayuda de celofán de tal forma que los moldes quedasen adheridos al mismo. Posteriormente, dichos moldes fueron adheridos a un cubreobjetos y se colocaron sobre el portaobjetos para poder visualizarlos en un microscopio óptico Leica DC5000 (Leica Microsystems S.L.U.). Se realizaron fotos de diferentes regiones de cada hoja y se analizaron empleando un programa de análisis de imagen, denominado ImageJ, el cual permitió obtener las medidas de la altura y anchura de cada estoma con las que luego se calculó el ratio medio de apertura estomática de cada muestra (diámetro menor/diámetro mayor). De esta forma, los ratios cercanos a 1 se correspondían con estomas abiertos y los cercanos a 0 con estomas cerrados. Esto se realizó en al menos 50 estomas por hoja, por tipo de tratamiento y por línea, de al menos 3 plantas independientes.

3.6. Medidas de la temperatura de las hojas

Con el fin de facilitar la medida de apertura estomática se realizaron, además, medidas de la temperatura de la hoja empleando una cámara térmica. Se conoce la existencia de correlación entre la temperatura de la hoja y el cierre estomático, de forma que hojas con los estomas más cerrados presentan temperaturas más altas, ya que su transpiración es menor. Para medir la temperatura se empleó la cámara Bosch GTC 400 C Professional y se tomaron fotografías de al menos 3 plantas independientes por tipo de tratamiento y por línea. Luego se analizaron con el software facilitado por Bosch (GTC Transfer Software: <https://www.bosch-professional.com/static/specials/gtc-transfer-software/download/es/es/>). Se tomaron medidas de temperatura de 5 puntos diferentes de cada hoja, en al menos 4 hojas por planta.

3.7. Medidas de la anchura de roseta

Se midió el diámetro, en centímetros, de la roseta de cada una de las plantas empleando una regla milimetrada.

3.8. Medidas del peso de la parte aérea

Para medir el peso de la parte aérea de cada planta se separaron y desecharon las raíces, cortándolas con ayuda de un bisturí, y luego, en una balanza de precisión se midió el peso en gramos de la parte aérea.

3.9. Diseño experimental y toma de muestra

3.9.1. Rastreo de mutantes

Para el rastreo de mutantes se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* de la línea WT, así como de las diferentes líneas mutantes, sembradas y crecidas en las condiciones descritas anteriormente. Las medidas de apertura estomática, de la temperatura de la hoja y la toma de muestra para los experimentos de análisis de la expresión génica se realizaron a las 24h del tratamiento con HB, justo antes de la infección (Figura 3.1). Las muestras empleadas para análisis de expresión génica se sumergieron en nitrógeno líquido rápidamente, y fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su uso. Por otro lado, las muestras necesarias para realizar el conteo bacteriano se tomaron transcurridas las 72 horas desde el momento de infección (Figura 3.1).

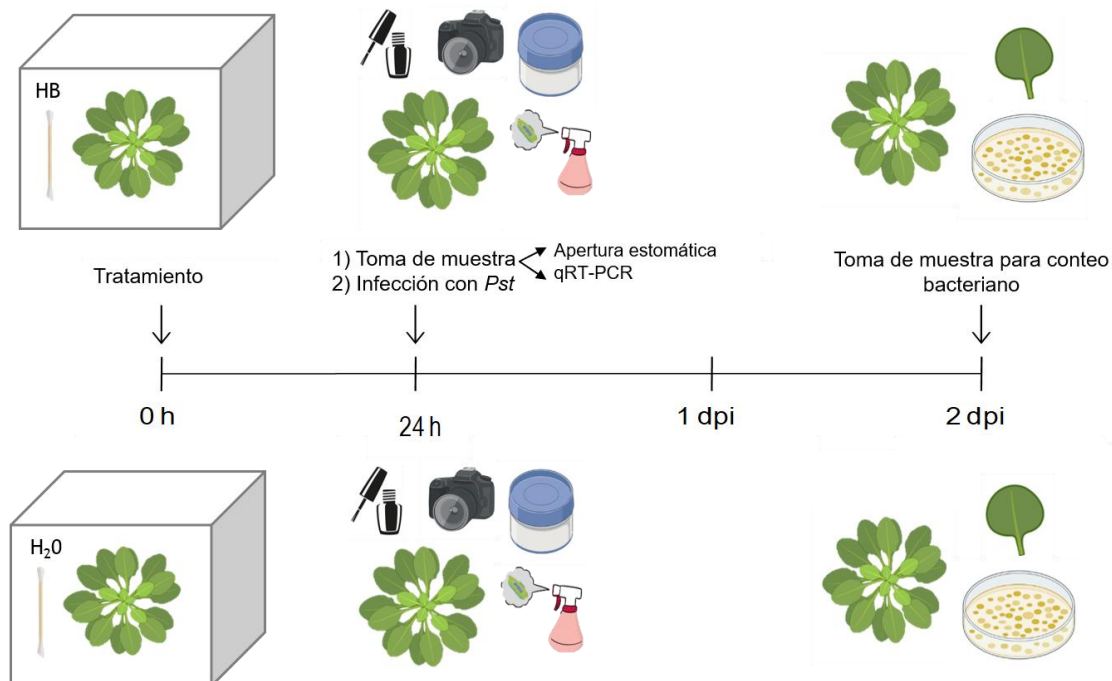


Figura 3.1. Esquema representativo del diseño experimental y la toma de muestra para el rastreo de mutantes. Se trató con H₂O para los controles (Parte inferior de la figura) y con HB (Parte superior). La toma de muestra para las medidas de apertura estomática y los análisis de expresión (qRT-PCR) se realizó a las 24 horas, justo antes de la infección con *Pst* DC3000. La toma de muestra para el conteo bacteriano se realizó transcurridos 2 días desde la infección. Dpi (días post-infección); h (horas).

3.9.2. Comunicación entre plantas

En este caso se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Ler* sembradas y crecidas en las condiciones ya descritas. A las 6 semanas de crecimiento se introdujeron en cajas de metacrilato, situando 12 plantas infectadas, con el inóculo descrito anteriormente,

alrededor de 4 plantas centrales sin infectar, estas últimas fueron tomadas como plantas de estudio (Figura 3.2). Además, se introdujo un algodóncillo hidrofílico con el volumen correspondiente de agua destilada (Figura 3.2). Como control negativo se realizó lo mismo, pero con plantas no infectadas y, como control positivo, se emplearon plantas no infectadas pero el algodóncillo hidrofílico contenía un volumen de HB correspondiente a una concentración de 5 μ M (Figura 3.2).

Las cajas se sellaron y se mantuvieron durante 3 días en el invernadero, a una temperatura de entre 18-25°C y un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). Transcurridos los 3 días se realizaron las medidas de apertura estomática y temperatura de la hoja, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, y se tomó muestra para los análisis de expresión génica (Figura 3.2). Todo ello únicamente en las 4 plantas centrales de cada caja (plantas de estudio) (Figura 3.2).

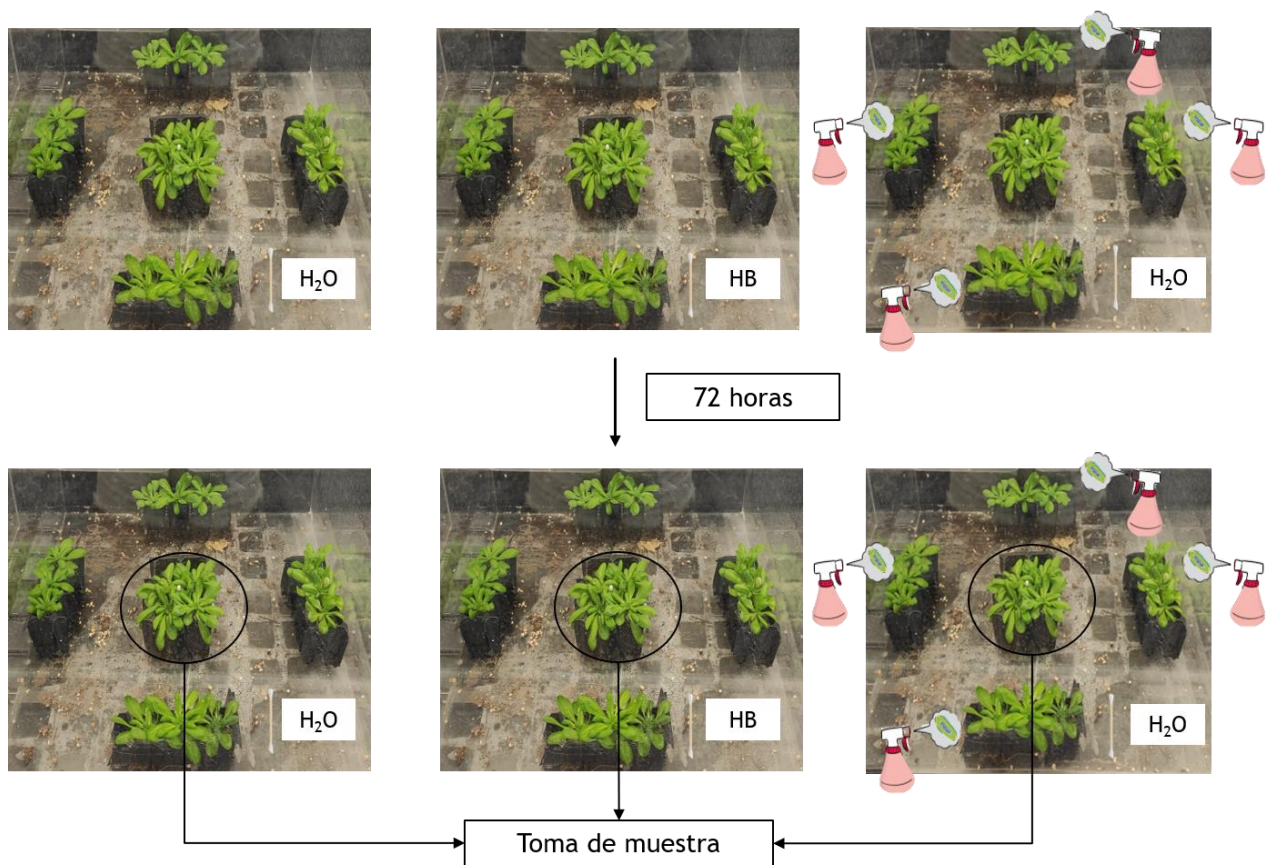


Figura 3.2. Esquema representativo del diseño experimental y la toma de muestra para el estudio de la comunicación entre plantas. En la parte superior se representan los diferentes tratamientos: en la primera caja se ilustran 4 plantas tratadas con H₂O rodeadas de 12 plantas sin infectar (controles negativos); en la segunda caja, 4 plantas tratadas con HB rodeadas de 12 plantas sin infectar (controles positivos); en la tercera caja, 4 plantas tratadas con H₂O rodeadas de doce plantas infectadas con *Pst* DC3000. En la parte inferior de la figura se representa la toma de muestra, realizada en las 4 plantas centrales de cada caja a las 72 horas tras el tratamiento.

3.9.3. Experimentos de Cultivo *in vitro*

Para los experimentos de cultivo *in vitro* se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipos *Ler* y *Col* de la línea WT, sembradas y crecidas en las condiciones ya descritas. Se

midieron la anchura de roseta y el peso de la parte aérea transcurridas 2 semanas y media desde la siembra.

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

3.10.1. Extracción y cuantificación de RNA total

Primero se homogeneizaron las muestras de tejido vegetal congelado en nitrógeno líquido, y luego se procedió a la extracción de RNA empleando el reactivo Extrazol (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States). Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron en hielo, con el fin de evitar la degradación del RNA, y las centrifugaciones se realizaron a 4 °C. Para ello se tomaron 100 mg de tejido vegetal, se añadió 1 mL de reactivo Extrazol y se agitaron por vórtex, luego se añadieron 200 µL de cloroformo, y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente tras agitarse de nuevo por vórtex. A continuación, se procedió a centrifugar durante 15 minutos a 13000 g y se recuperó el sobrenadante, entonces se añadieron 500 µL de isopropanol, y se agitó manualmente antes de incubar 5 min a temperatura ambiente. Una vez obtenido el sedimento, se lavó el pellet con etanol (EtOH) al 75% preparado con agua tratada con dietilpirocarbonato (H₂O DEPC), se centrifugó durante 5 minutos a 7000 revoluciones por minuto (rpm) y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendió el sedimento en un volumen de 90 µL de H₂O DEPC y se añadieron 10 µL de acetato de sodio (AcNa) 3M junto con 250 µL de EtOH al 100%, entonces se centrifugó a 13000 g durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante dejando secar el pellet a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el sedimento en 35 µL de H₂O DEPC, se calentó en un termobloque a 65 °C durante 5 minutos y, tras una centrifugación de 10 minutos a 10000 rpm, se recuperó el sobrenadante pasándolo a un nuevo eppendorf.

Posteriormente, se realizó un tratamiento con la enzima DNasa, lo cual nos permitió eliminar los posibles contaminantes de DNA genómico, para ello se utilizó el kit comercial TURBO DNase (Ambion Austin, TX, United States).

Por último, se cuantificó el RNA extraído empleando un espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop ND-1000, calibrado con un blanco de H₂O DEPC. Se calculó la concentración de RNA a partir de la absorbancia medida a 260nm, asegurándonos de que todos los RNAs utilizados presentaban valores comprendidos entre 1.8-2.0 para ratios de absorbancia A_{260/280} y A_{260/230}, lo cual indica una buena calidad de la muestra.

Para realizar la reacción de retrotranscripción, que consiste en la síntesis de cDNA a partir del RNA obtenido, se utilizó el kit comercial PrimeScriptTM RT Reagent Kit (Perfect Real Time, Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) siguiendo los pasos indicados en el protocolo facilitado por el fabricante.

3.10.2. Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)

Para realizar la PCR cuantitativa se empleó el reactivo de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), añadiendo 10 µL del mismo a cada pocillo en una placa de 96

pocillos *MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate* (Applied Biosystems). Luego se selló la placa cuidadosamente sin dejar burbujas de aire.

La amplificación se monitorizó a tiempo real usando el sistema de PCR en tiempo real 1500 Fast (Life Technologies). Como control positivo del experimento, se utilizó en todos los casos el gen ubiquitina. Se realizaron 3 repeticiones técnicas de cada réplica biológica de cDNA y las secuencias de los oligonucleótidos empleados se recogen en la siguiente tabla:

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
UBQ	GCTCTTATCAAAGGACCTTCGG	CGAACTTGAGGAGGTTGCAAAG
PR1	GGAGCTACGCAGAACAATAA GA	CCCACGAGGATCATAGTTGCAACTGA
ERF11	CGTGGAGCTAAAGCCAAAAC	ACACCATCATCCCAGCCTTA
MYC2	TCCGAGTCCGGTTCATTCT	TCTCGGGAGAAAGTGTTATTGAA
PDF1.2	GTTCTCTTTGCTGCTTTCGAC	GCAAACCCCTGACCATGT
VSP2	ATGCCAAAGGACTTGCCCTA	CGGGTCCGGTCTTCTCTGTTC

Tabla 4: Oligonucleótidos empleados como cebadores en los experimentos de qRT-PCRs

3.11. Análisis estadísticos

Se realizaron diversos tipos de análisis empleando dos programas distintos. Para analizar la normalidad de las muestras se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk empleando el programa IBM SPSS Statistics.

Para la comparación de dos grupos de muestras con distribuciones normales se llevó a cabo la prueba T de student con el programa MS Excel de la suite Microsoft Office. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los dos grupos: un asterisco indica un p -value < 0.05 , dos asteriscos $p < 0.01$ y tres asteriscos $p < 0.001$. La ausencia de asteriscos indica que las diferencias no son significativas ($p > 0,05$)

Para comparar dos grupos de muestras independientes con distribuciones no normales se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney empleando el programa IBM SPSS Statistics. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos grupos. Las letras iguales indican que las diferencias no son significativas ($p > 0,05$).

Para comparar más de dos grupos de muestras con distribuciones normales se empleó el programa IBM SPSS Statistics, realizándose análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y test de comparaciones múltiples empleando el estadístico SNK. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos.

Cada experimento se realizó tres veces de manera independiente con un mínimo de tres réplicas en cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar (SD).

4. Resultados y discusión

4.1. El HB induce el cierre estomático en *Arabidopsis thaliana*

En estudios realizados anteriormente se demostró que el HB, junto a otros compuestos volátiles, era capaz de inducir el cierre estomático en plantas de tomate (López-Gresa et al., 2018). Con el fin de profundizar en el mecanismo por el cual este compuesto induce el cierre de los estomas, quisimos comprobar cómo actuaba en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* y *Ler*. Para ello se analizó el ratio de apertura estomática y la temperatura de la hoja, en plantas *Col-0* y *Ler*, a las 24 horas de ser tratadas con HB. Como se aprecia en la figura 4.1 las plantas control presentan un mayor ratio de apertura estomática (diámetro menor/ diámetro mayor) que las plantas tratadas con HB, lo que parece indicar que el HB induce el cierre estomático en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* y *Ler*.

Por otro lado, se conoce la existencia de una correlación entre la temperatura de la hoja y las variaciones en el proceso de apertura y cierre estomático de forma que, hojas con los estomas más cerrados presentan temperaturas más altas (Locascio et al., 2019; Merlot et al., 2002; Wang et al., 2004). Por tanto, con el fin de complementar la medida de apertura estomática se realizaron, medidas de la temperatura de la hoja empleando una cámara térmica. En la figura 4.2 se muestra que las plantas *Col-0* y *Ler* tratadas con HB presentan mayor temperatura que las no tratadas, lo cual refuerza los resultados obtenidos en el análisis del ratio de apertura estomática.

Tanto el aumento de temperatura como el cierre estomático son más notables en las plantas *Ler* que en las *Col-0*, lo cual podría deberse a que las plantas *Ler* son capaces de sintetizar GLVs y, por tanto, podrían ser más sensibles a éstos. Sin embargo, esto no ocurre en *Col-0* puesto que carece de una enzima HPL funcional siendo incapaz de producir estos compuestos (Duan et al., 2005).

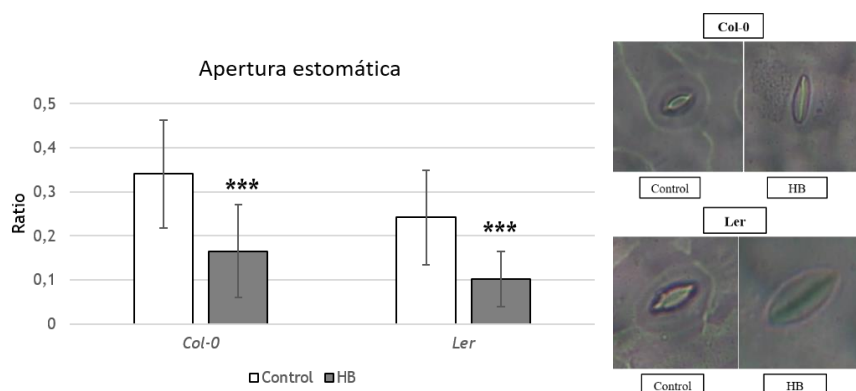


Figura 4.1 Ratio de apertura estomática en plantas de *A. thaliana*. En la parte izquierda se representa la gráfica de los datos obtenidos al analizar el ratio (diámetro menor/ diámetro mayor) de apertura estomática en plantas *Col-0* y *Ler* tratadas durante 24 h con H₂O (control) o con HB. Los ratios cercanos a 1 se correspondían con estomas abiertos y los cercanos a 0 con estomas cerrados. En la parte derecha se representan imágenes de los estomas tomadas con el microscopio óptico. El triple asterisco (***) indica que existe una significación estadística con un p-value < 0,001 entre las plantas control y las plantas tratadas

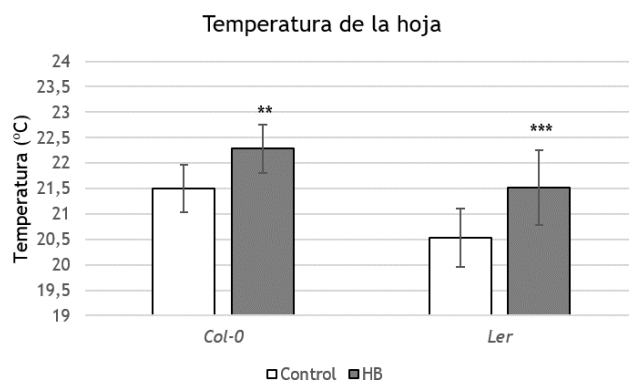


Figura 4.2. Temperatura de las hojas de plantas de *A. thaliana*. Se representa la gráfica de los datos obtenidos al analizar la temperatura de la hoja en plantas *Col-0* y *Ler* tratadas durante 24 h con H₂O (control) o con HB. El triple asterisco (***) indica que existe una significación estadística con un p -value < 0.001 entre las plantas control y las plantas tratadas y el doble asterisco (**) que existe una significación estadística con un p -value < 0.01.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, en los que se observó que el HB mediaba el cierre estomático en varias especies de plantas de los géneros *Nicotiana*, *Arabidopsis*, *Medicago*, *Zea* y *Citrus* (López-Gresa et al., 2018). Asimismo, nos permiten continuar con el estudio del modo de acción del HB en *Arabidopsis thaliana*, con las ventajas que ello supone. 4.2. El HB induce ciertas rutas de señalización defensivas en *Arabidopsis thaliana*

La inducción defensiva de las plantas está mediada por complejas rutas de señalización en las cuales diversas hormonas vegetales desempeñan importantes funciones. Entre estas hormonas se encuentran el SA, el JA y el ET. La ruta dependiente de SA se suele asociar con respuesta defensiva frente a patógenos bióticos, mientras que la ruta de JA junto a la del ET está asociada a la regulación de respuestas defensivas frente a herbívoros. Además se conoce que la ruta de señalización dependiente de SA y la ruta de JA actúan de forma antagonista y poseen roles contrarios en las respuestas defensivas (Glazebrook, 2005)

Se ha demostrado en estudios anteriores que ciertos GLVs, entre ellos el HB, son capaces de inducir las respuestas defensivas de las plantas activando componentes implicados en algunas de estas rutas (Ozáez., 2017López-Gresa et al., 2018;). Como por ejemplo la inducción de las proteínas PR en plantas de tomate pretratadas con HB, entre ellas PR1 (*Pathogenesis-Related Protein 1*) (Ozáez., 2017López-Gresa et al., 2018;), cuyo gen se suele emplear como marcador de la ruta dependiente de SA. En base a esto, y con el fin de dilucidar a través de qué rutas de señalización actúa el HB, en este trabajo se analizó cuantitativamente la expresión de genes marcadores de cada una de estas vías en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* y *Ler* tratadas con HB durante 24 h.

Para evaluar la respuesta defensiva mediada por JA y ET se emplearon los genes marcadores *MYC2* (*MYC2 Transcription Factor*), *ERF1* (*Ethylene-Responsive Transcription Factor 1*), *VSP2* (*Vegetative Storage Protein 2*) y *PDF1.2* (*Plant Defensin1.2*). En respuesta a etileno, *ERF1* activa la expresión de proteínas de defensa

como *PDF1.2* implicadas en la resistencia frente a patógenos necrotróficos o hemibiotróficos. Por otro lado, se sabe que en respuesta a JA, *MYC2* activa a *VSP2* para responder frente a la defensa y que a su vez *MYC2* inhibe a *ERF1* siendo estos antagonistas (Lorenzo et al., 2004; Yang et al., 2019). Por otro lado, para evaluar la respuesta dependiente de SA el gen marcador que se empleó fue *PR1*.

Los resultados obtenidos de estos análisis de expresión se muestran en la figura 4.3. Se observó que las plantas *Col-0* y *Ler* tratadas con HB presentaron niveles de expresión significativamente más altos para los genes *PR1* y *ERF1* con respecto a las controles. Además el gen *PDF1.2* también se expresó más en las plantas tratadas con HB, aunque no de forma significativa. Por otro lado, la expresión de *VSP2* se redujo de forma significativa en *Col-0* y *Ler* tratadas con HB, mientras que, en *MYC2* esta reducción no fue significativa.

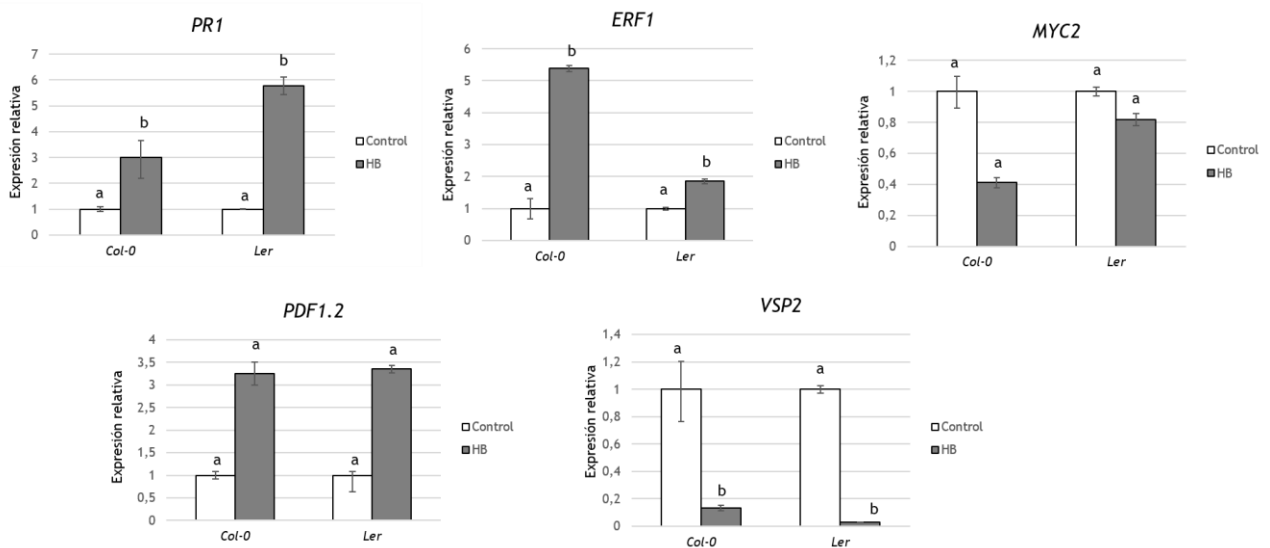


Figura 4.3. Expresión relativa de los genes *PR1*, *ERF1*, *MYC2*, *PDF1.2* y *VSP2* en plantas *Col-0* y *Ler*. Se representan los niveles de expresión de los distintos genes en plantas tratadas o no (control) con HB (HB) durante 24 horas. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen ubiquitina. Se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico Mann-Whitney y las letras diferentes indican diferencias significativas con un p -value < 0.05 entre las plantas tratadas y las controles.

La inducción de *PR1* concuerda con lo observado en estudios anteriores en plantas de tomate tratadas con HB, indicando que este compuesto podría actuar como inductor de la respuesta defensiva en plantas de *Arabidopsis thaliana*, lo que podría llevar a un aumento en la resistencia frente a patógenos de tipo biotrofo (Ozáez., 2017; López-Gresa et al., 2018).

Por otra parte, la inducción observada para *ERF1* y consiguiente represión de *MYC2* parecen indicar que de las dos ramas mediadas por JA, HB activaría la respuesta defensiva frente a patógenos necrotróficos, induciendo genes tales como *PDF1.2*, y reprimiría la ruta de respuesta herida, como así indican los menores niveles observados para *VSP2*. No obstante, experimentos futuros con un mayor número de repeticiones se realizarán para confirmar que las diferencias observadas son significativas para todos los genes analizados.

Nuestros resultados sugieren que tratamientos con HB podrían inducir resistencia no sólo a patógenos de tipo biotrofo sino también a patógenos necrotrofos, aumentando así las posibilidades de uso de este compuesto patentado y cobrando todavía más interés el estudio de su modo de acción.

4.3. El HB inhibe el crecimiento en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0*

Diversos estudios han definido las vías de señalización de las plantas a través de la identificación de mutantes que suprimen la respuesta a una perturbación u hormona en particular, determinando así el modo de acción de la misma. Se conoce que ciertos VOCs como el MeJA son capaces de inhibir el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Adams & Turner, 2010). Con el fin de facilitar el futuro rastreo de mutantes insensibles a HB, se realizaron ensayos de inhibición de crecimiento para comprobar si el HB, al igual que otros compuestos como el MeJA, inhibe el crecimiento de las plantas en condiciones de cultivo *in vitro*.

Como se muestra en la figura 4.4, en las plantas *Col-0* crecidas en medio MS suplementado con 100 μM de HB se observó una disminución significativa de la anchura de roseta, así como del peso de la parte aérea, en comparación con las plantas control, crecidas en medio MS sin suplementar. Además, el peso de la parte aérea también fue significativamente menor en las plantas *Col-0* crecidas en condiciones de 50 μM HB y se observó cierta reducción en la anchura de roseta, aunque ésta resultó no ser significativa. Por otro lado, en las plantas *Ler* no se observaron cambios significativos ni en la anchura de roseta ni en el peso de la parte aérea entre las diferentes condiciones de crecimiento.

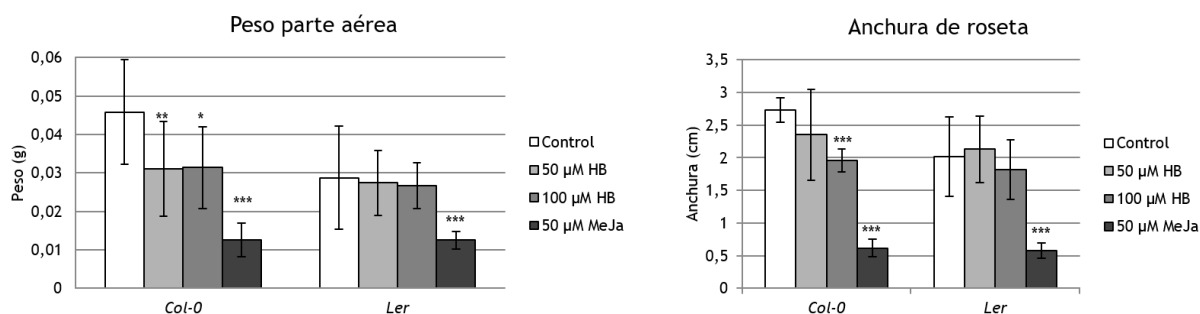


Figura 4.4. Medidas del peso de la parte aérea y de la anchura de roseta en plantas de *A. thaliana*. Se representan las medidas de peso de la parte aérea y anchura de roseta de plantas ecotipo *Col-0* y *Ler* crecidas en medio MS (control), en medio MS suplementado con 50 μM MeJA (controles positivos) o en medio MS suplementado con HB a 50 μM y 100 μM . El peso se representa en gramos (g) y la anchura en centímetros (cm). El triple asterisco (***) indica que existe una significación estadística con un p-value < 0.001 entre las plantas control y las plantas tratadas, el doble asterisco (**) que existe una significación estadística con un p-value < 0.01, y el asterisco (*) con un p-value < 0.05.

Esto podría indicar que, al igual que otros compuestos volátiles, como el MeJA (Adams & Turner, 2010), el HB es capaz de inhibir el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0*. Otros estudios han descrito este fenómeno de inhibición de crecimiento producido por los VOCs, por ejemplo se ha observado que plantas de *Arabidopsis*, crecidas

en presencia de VOCs emitidos por hongos, presentan alteraciones en el desarrollo, entre las que se encuentran la inhibición de crecimiento (Lee et al., 2016). Asimismo, existe una clara correlación entre el cierre estomático y el crecimiento de las plantas, puesto que la fotosíntesis se ve reprimida al reducir el intercambio gaseoso. Nuestros resultados confirmarían dicha correlación, puesto que las plantas crecidas en el medio con HB presentarían los estomas más cerrados (Figura 4.1). Sin embargo, sorprende que no se haya observado un efecto significativo en el ecotipo *Ler* que parece ser más sensible en cuanto al cierre de los estomas se refiere (Figuras 4.1 y 4.2). Experimentos futuros deberían llevarse a cabo para comprender mejor estas observaciones.

Así pues, hemos conseguido determinar las condiciones para poder llevar a cabo un rastreo de mutantes insensibles a HB en el fondo *Col-0*, que nos permitiría la identificación de genes que participen en el modo de acción de dicho compuesto volátil.

4.4. Inducción del cierre estomático y de la respuesta defensiva mediada por la comunicación entre plantas de *Arabidopsis thaliana*

Como se ha descrito anteriormente, se sabe que los compuestos orgánicos volátiles juegan un papel importante en la activación de la respuesta defensiva de las plantas. Cuando las plantas son atacadas por ciertos patógenos, éstas emiten diversas señales, entre ellas VOCs, que son percibidas por las plantas vecinas receptoras de estos volátiles (plantas rVOCs), preparándolas para futuros ataques desencadenando la SAR, que conduce a un aumento en la síntesis de SA, así como a la expresión de genes de defensa y la síntesis de proteínas PR (Scala, Allmann, et al., 2013).

Con el fin de conocer el proceso de activación de las defensas en plantas vecinas mediado por VOCs, se realizó un experimento de comunicación entre plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Ler*, las cuales se conoce que son capaces de emitir compuestos volátiles, como el HB, cuando son infectadas por *Pseudomonas syringae* (Wenig et al., 2019). Para ello se situaron, en el interior de cajas de metacrilato, 12 plantas infectadas con la bacteria *Pst* DC3000 alrededor de 4 plantas sin infectar y tratadas con H₂O, y se midió el ratio de apertura estomática y la temperatura de las hojas de las 4 plantas centrales, receptoras de los volátiles emitidos (rVOCs), pasadas 72 horas. Como controles positivos se emplearon 4 plantas sin infectar situadas alrededor de 12 plantas sin infectar y tratadas con HB durante 72 horas (HB) y como controles negativos 4 plantas sin infectar situadas alrededor de 12 plantas sin infectar y tratadas con H₂O durante 72 horas (control; apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos).

Se observó que las plantas rVOCs, situadas cerca de plantas infectadas, mostraban un ratio de apertura significativamente menor que las plantas control, pero significativamente mayor que las plantas tratadas con HB exógeno (HB) (Figura 4.5). Además, se observó un aumento significativo en la temperatura de las hojas de las plantas rVOCs y tratadas con HB con respecto a las plantas control, que correlaciona con el cierre estomático observado (Figura 4.5). Estos resultados indican que entre los efectos de la comunicación entre

plantas podría incluirse la inducción del cierre estomático siendo posible que en ello estén implicados algunos compuestos volátiles como el HB.

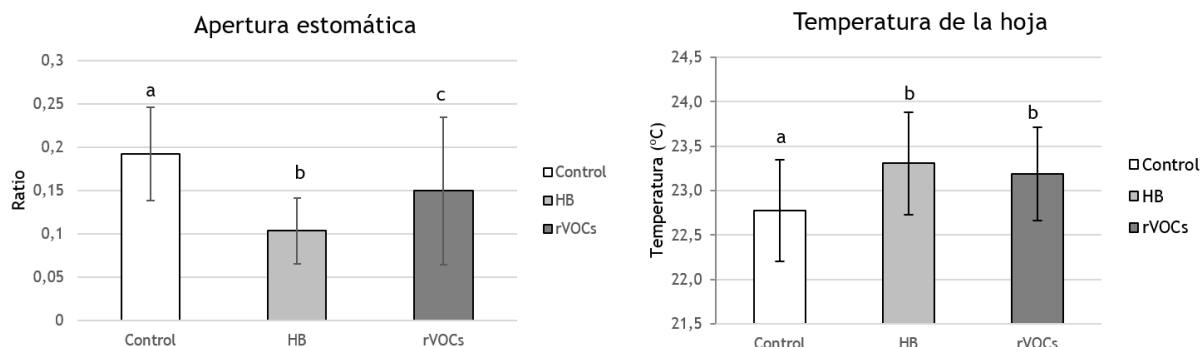


Figura 4.5. Ratio de apertura estomática y temperatura de la hoja en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Ler* situadas alrededor de plantas *Ler* infectadas con *Pst* DC3000, o sin infectar y plantas tratadas con HB. Se representa el ratio de apertura estomática y la temperatura de la hoja de: plantas sin infectar situadas alrededor de plantas sin infectar y tratadas con H₂O durante 72 horas (Control), plantas sin infectar situadas alrededor de plantas sin infectar y tratadas con HB durante 72 horas (HB) y de plantas sin infectar situadas alrededor de plantas infectadas con *Pst* DC3000 y tratadas con H₂O durante 72 horas (rVOCs). Se realizó un test ANOVA y las letras diferentes indican diferencias significativas con un p-value < 0.05 entre los diferentes grupos

Por otro lado, con el fin de conocer si la comunicación entre plantas mediada por VOCs es capaz de inducir las respuestas defensivas en las plantas rVOCs de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Ler* se analizaron también los niveles de expresión de los mismos genes marcadores empleados en el apartado 4.3 de este trabajo (*PR1*, *ERF1*, *MYC2*, *PDF1.2* y *VSP2*). Este análisis se realizó en las 4 plantas centrales de cada tratamiento descrito anteriormente (Control, HB y rVOCs). Como muestra la Figura 4.6, las plantas vecinas de las plantas infectadas (rVOCs) mostraban una inducción significativa en la expresión relativa de los genes *PR1*, *ERF1* y *MYC2* con respecto a los controles. Mientras que para los genes *PDF1.2* y *VSP2* esta inducción no fue significativa.

Es interesante destacar que, en los tratamientos con HB, todos los genes, excepto *PR1*, mostraron respuestas contrarias a las descritas anteriormente para las plantas *Ler* tratadas con HB durante 24 horas. Esto podría deberse a la duración del tratamiento que, en este caso, fue de 72 horas. De este modo, *ERF1* y *PDF1.2* se indujeron en las plantas situadas cerca de otras infectadas mientras que se reprimieron en las tratadas exógenamente con HB. Con respecto a *VSP2*, cabe resaltar que presentó mayor inducción en las plantas tratadas con HB que en las plantas situadas cerca de otras infectadas. De cualquier forma, se volvió a confirmar el antagonismo entre *ERF1* y *MYC2*, así como la consiguiente represión y activación de *PDF1.2* y de *VSP2*, respectivamente. En el futuro se llevarán a cabo experimentos de cinética de inducción de estos genes para comprender mejor su papel en la señalización mediada por HB.

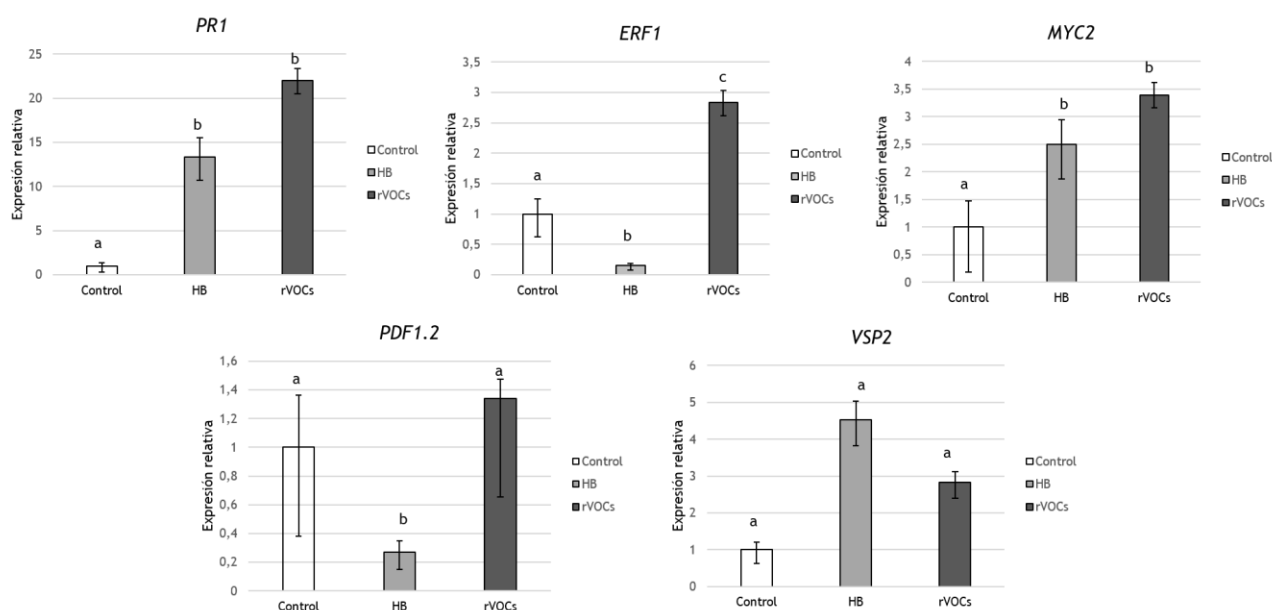


Figura 4.6. Expresión relativa de los genes PR1, ERF11, MYC2, PDF1.2 y VSP2 en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Ler* situadas alrededor de plantas *Ler* infectadas, o no, con *Pst* DC3000. Se representan los niveles de expresión de los distintos genes en: plantas sin infectar situadas alrededor de plantas sin infectar y tratadas con H₂O durante 72 horas (Control), plantas sin infectar situadas alrededor de plantas sin infectar y tratadas con HB durante 72 horas (HB) y de plantas sin infectar situadas alrededor de plantas infectadas con *Pst* DC3000 y tratadas con H₂O durante 72 horas (rVOCs). Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen ubiquitina. Se realizó un test ANOVA y las letras diferentes indican diferencias significativas con un p-value < 0.05 entre los diferentes grupos.

En base a estos datos podríamos afirmar que existe una comunicación entre plantas de *Arabidopsis thaliana* mediada por los VOCs producidos por plantas infectadas con *Pst*, que es capaz de inducir la respuesta defensiva en plantas receptoras (rVOCs) a través del cierre estomático y de la activación de la síntesis de proteínas de defensa, tales como PR1.

Todos estos datos concuerdan con los previamente descritos en plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con *Pseudomonas syringae* en las que se observó que la emisión de monoterpenos volátiles como el α -pineno, β -pineno o el canfeno, causaba en las plantas vecinas la activación de la SAR así como, de genes de defensa como PR1 (Wenig et al., 2019).

4.5. Estudio de genes implicados en la señalización mediada por HB en *Arabidopsis thaliana*

En base a los resultados anteriores y con el fin de identificar componentes moleculares que participan en la cascada de transducción de señal activada por el HB, se procedió a la caracterización de la respuesta a dicho volátil de diferentes mutantes de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* que presentan mutaciones en genes implicados en los eventos de señalización tempranos de la respuesta defensiva frente a bacterias, así como, en la regulación estomática en respuesta al ataque de patógenos. Entre estos genes encontramos los anteriormente mencionados *BAK1*, *BAK8*, *MPK6* y *ABI1* (descritos en los apartados 1.3, 1.4 y 3.1). En concreto, los mutantes empleados fueron *bak1-3*, *bak1-5*, *mpk6*, *prp6* y

abi1-1 (descritos en la Tabla 1) y se estudió el efecto que producen los tratamientos exógenos con HB sobre el cierre estomático y la resistencia a la infección por *Pst*.

Para el estudio del cierre estomático, se realizaron medidas tanto del ratio de apertura estomática como de la temperatura de la hoja en las plantas *Col-0* y en las plantas mutantes tratadas, o no, con HB durante 24 horas. Se observó una inducción del cierre estomático en respuesta al HB en plantas *Col-0*, ya que el ratio fue menor y la temperatura mayor que las plantas control (Figura 4.7), lo cual concuerda con lo observado en los resultados anteriores (Figuras 4.1 y 4.2). Tanto los mutantes *abi1-1* como los mutantes *bak1-5* se comportaron como las plantas *Col-0*, aunque no se observaron diferencias significativas en la temperatura de la hoja de los mutantes *bak1-5* con respecto a los no tratados.

Por otro lado, los mutantes *bak1-3*, *mpk6* y *prp6* no presentaron diferencias significativas en la apertura estomática al ser tratados con HB (Figura 4.7). Con respecto a la temperatura, se observó que, en los mutantes *bak1-3* tratados con HB aumentó significativamente, y en los mutantes *prp6* tratados con HB disminuyó de forma significativa, mientras que en los mutantes *mpk6* no se observaron diferencias significativas.

Además, se observó que, en el caso de las plantas controles sin tratar, los mutantes *mpk6* y *prp6* presentaron un ratio de apertura significativamente menor que los WT (*Col-0*), esto también ocurre en el resto de mutantes aunque no de forma significativa (Figura 4.7). En lo que respecta a la temperatura se observaron temperaturas significativamente mayores en todos los mutantes en comparación a las plantas WT (*Col-0*).

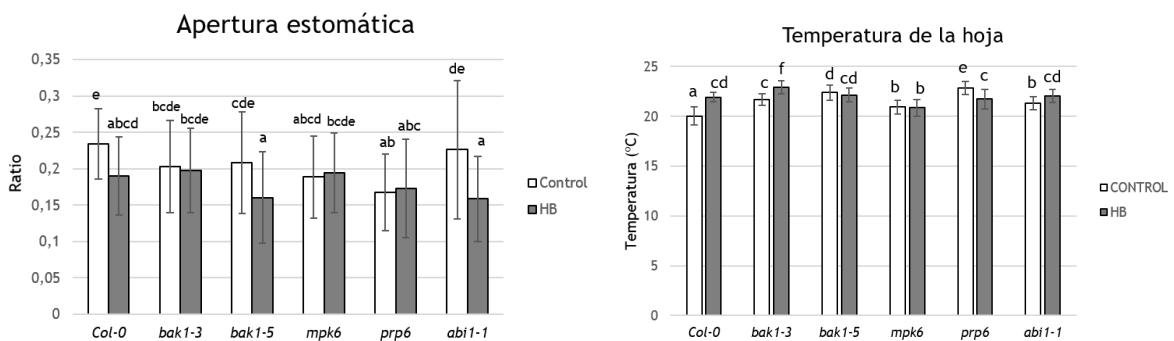


Figura 4.7. Ratio de apertura estomática y temperatura de la hoja en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* WT y mutantes tratadas, o no, HB. Se representa el ratio de apertura estomática y la temperatura de la hoja de: plantas *Col-0* WT (*Col-0*) y de los mutantes *bak1-3*, *bak1-5*, *mpk6*, *prp6* y *abi1-1* tratados con H₂O durante 24 horas (Control) y con HB durante 24 horas (HB). Se realizó un test ANOVA y las letras diferentes indican diferencias significativas con un p-value < 0.05 entre los diferentes grupos.

Los resultados conjuntos del ratio de apertura estomática y de temperatura parecen indicar que *mpk6* estaría implicado en la señalización del cierre estomático mediado por HB en *Arabidopsis thaliana*.

Para el estudio de la resistencia frente a la infección se emplearon las mismas plantas y los mismos tratamientos que los empleados para el estudio de cierre estomático, posteriormente se infectaron las plantas con la bacteria *Pst* DC3000 durante 72 horas y se

realizó el conteo bacteriano midiendo las unidades formadoras de colonias (CFU) presentes en las hojas (detallado en los apartados 3.4.4 y 3.9.1).

Se observó una disminución significativa en el número de unidades formadoras de colonias en las plantas *Col-0* y en los mutantes *bak1-5* tratados con HB con respecto a los no tratados (Control) (Figura 4.8), lo cual concuerda con los datos obtenidos para el cierre estomático (Figura 4.7). Esto también ocurrió en los mutantes *abi1-1* aunque no de forma significativa (Figura 4.8). En el resto de mutantes tratados con HB, no se observaron diferencias significativas en el número de colonias con respecto a sus correspondientes controles sin tratar, correlacionando con los resultados obtenidos en los estudios de apertura estomática (Figura 4.7, panel izquierdo), y sugiriendo que podrían estar implicados en la resistencia a bacteria mediada por HB.

Centrándonos en las plantas no tratadas, se observó que los mutantes *bak1-5* son significativamente más susceptibles a la bacteria, ya que presentaron mayor número de CFUs que las plantas WT (*Col-0*). Esto concuerda con lo descrito en otros estudios en los que se observó que las plantas *bak1-5* estaban afectadas en la señalización de PTI, lo que explicaría la mayor susceptibilidad a la bacteria (Schwessinger et al., 2011). Este aumento en la susceptibilidad frente a patógenos también se ha demostrado para *bak1-3* (He et al., 2007), aunque en nuestros resultados no se observa de forma significativa.

En el resto de mutantes no tratados, no se observaron diferencias significativas con respecto a las plantas WT, lo que podría deberse a la existencia de redundancia de función. Esto se ha observado en otros estudios, como es el caso de *MPK3* y *MPK6* que muestran redundancia de función en la inmunidad estomática y apoplástica (Su et al., 2017).

Teniendo en cuenta los resultados conjuntos de apertura estomática, temperatura y resistencia, *MPK6* parece ser un componente molecular clave en la cascada de transducción de señal activada por HB en *Arabidopsis thaliana*. Por otra parte, los resultados conjuntos de la apertura estomática y resistencia, ampliarían los candidatos a *BAK1* y *BAK8*, que también podrían formar parte de dicha cascada, tal y como muestran los resultados obtenidos para sus mutantes correspondientes (*bak1-3*, *bak1-5* y *prp6*). Experimentos con dobles mutantes serían de gran interés para descartar la posibilidad de redundancia de función, que se ha demostrado para *MPK3* y *MPK6*.

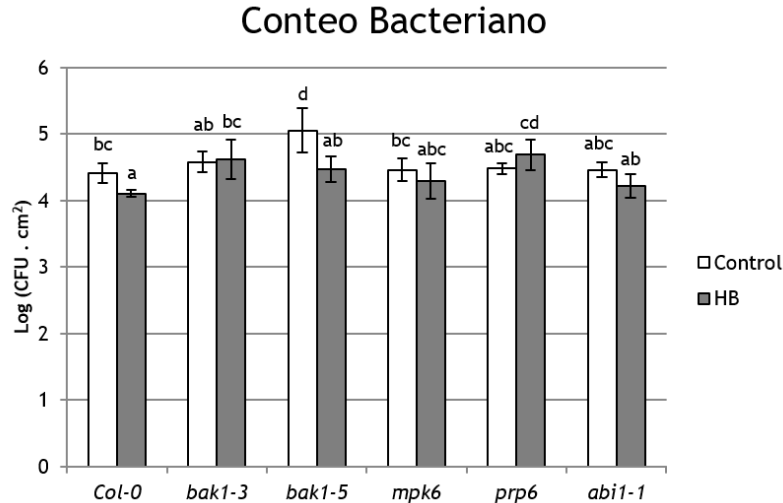


Figura 4.8. Crecimiento de *Pst* DC3000 en hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* WT y mutantes tratadas, o no, con HB durante 24 horas. Se representa el logaritmo de CFU (unidades de colonias formadoras) por centímetro cuadrado (Log (CFU · cm²)) medido en: plantas *Col-0* WT (*Col-0*) y mutantes *bak1-3*, *bak1-5*, *mpk6*, *prp6* y *abi1-1*, tratados con H₂O durante 24 horas (Control) y con HB durante 24 horas (HB) que, posteriormente, fueron infectados con *Pst* DC3000 durante 72 horas. Se realizó un test ANOVA y las letras diferentes indican diferencias significativas con un p-value < 0.05 entre los diferentes grupos.

4.6. Perspectivas futuras

En este Trabajo Fin de Máster se ha demostrado la importancia del HB en la respuesta defensiva de plantas de *Arabidopsis thaliana* frente a patógenos como *Pst* DC3000. Se ha observado que el aumento de resistencia producido por este compuesto frente a la infección de *Pst* DC3000 se debe principalmente a que está implicado en la inducción del cierre estomático, además de que es capaz de activar diferentes genes defensivos. Entre ellos genes implicados en la resistencia frente a patógenos de tipo biotrofo, como *PR1*, pero también genes implicados en la resistencia frente a necrotrofos, como *PDF1.2* o *ERF1*.

Por otro lado, se ha comprobado la existencia de una comunicación entre plantas de *Arabidopsis thaliana* mediada por los VOCs producidos por plantas infectadas con *Pst*, que es capaz de inducir la respuesta defensiva en plantas receptoras (rVOCs) a través del cierre estomático y de la activación de la síntesis de proteínas de defensa, tales como *PR1*. En un futuro sería interesante llevar a cabo experimentos de cinética de inducción de los genes implicados en las vías de señalización de JA y ET para comprender mejor su papel en la señalización mediada por HB.

También hemos conseguido determinar las condiciones para poder llevar a cabo un rastreo de mutantes insensibles a HB en el fondo *Col-0*, que, en un futuro, nos permitiría la identificación de genes que participen en el modo de acción de dicho compuesto volátil.

Por último, sería interesante llevar a cabo ensayos de inhibición de crecimiento *in vitro* para los mutantes *bak1-3*, *bak1-5*, *mpk6* y *prp6* que nos permitan confirmar su papel en la

señalización mediada por HB, así como el estudio de dobles mutantes afectados en los genes BAK1 y BAK8 (*bak1-3prp6*) para eliminar el posible efecto de la redundancia de función.

5. Conclusiones

El HB es capaz de inducir el cierre estomático en plantas de *Arabidopsis thaliana* y además podría inducir resistencia no sólo a patógenos de tipo biotrofo sino también a patógenos necrotrofos, aumentando así las posibilidades de uso de este compuesto patentado.

Este compuesto volátil es capaz de inhibir el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de cultivo *in vitro*, lo que confirma la existencia de una clara correlación entre el cierre estomático y el crecimiento de las plantas y permite el rastreo de mutantes insensibles a HB mediante el estudio de inhibición de crecimiento.

Existe una comunicación entre plantas de *Arabidopsis thaliana* mediada por los VOCs producidos por plantas infectadas con *Pst* que es capaz de inducir la respuesta defensiva en plantas receptoras (rVOCs) a través del cierre estomático y de la activación de la síntesis de proteínas de defensa, tales como *PRI*.

Según nuestros estudios de apertura estomática y resistencia a *Pst*, los genes *BAK1*, *BAK8* y *MPK6* parecen ser componentes moleculares clave en la cascada de señalización activada por tratamientos con HB en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

6. Bibliografía

- Adams, E., & Turner, J. (2010). COI1, a jasmonate receptor, is involved in ethylene-induced inhibition of Arabidopsis root growth in the light. *Journal of Experimental Botany*, *61*(15), 4373–4386. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq240>
- Ameys, M., Allmann, S., Verwaeren, J., Smagghe, G., Haesaert, G., Schuurink, R. C., & Audenaert, K. (2018). Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis. *New Phytologist*, *220*(3), 666–683. <https://doi.org/10.1111/nph.14671>
- Cascone, P., Iodice, L., Maffei, M. E., Bossi, S., Arimura, G., & Guerrieri, E. (2015). Tobacco overexpressing β -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, *173*, 28–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.08.011>
- Croft, K. P. C., Jüttner, F., & Slusarenko, A. J. (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiology*, *101*(1), 13–24. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.13>
- Das, A., Lee, S. H., Hyun, T. K., Kim, S. W., & Kim, J. Y. (2013). Plant volatiles as method of communication. *Plant Biotechnology Reports*, *7*(1), 9–26. <https://doi.org/10.1007/s11816-012-0236-1>
- Dressano, K., Ceciliato, P. H. O., Silva, A. L., Guerrero-Abad, J. C., Bergonci, T., Ortiz-Morea, F. A., Bürger, M., Silva-Filho, M. C., & Moura, D. S. (2017). BAK1 is involved in AtRALF1-induced inhibition of root cell expansion. In *PLoS Genetics* (Vol. 13, Issue 10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007053>
- Duan, H., Huang, M. Y., Palacio, K., & Schuler, M. A. (2005). Variations in CYP74B2 (Hydroperoxide Lyase) gene expression differentially affect hexenal signaling in the Columbia and Landsberg erecta ecotypes of Arabidopsis. *Plant Physiology*, *139*(3), 1529–1544. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067249>
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, *198*(1), 16–32. <https://doi.org/10.1111/nph.12145>
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I. (2006). Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *25*(5), 417–440. <https://doi.org/10.1080/07352680600899973>
- Finkelstein, R. R., Somerville, C. R., Barbara, S., & Lansing, E. (1990). Mutations of Arabidopsis Define Genes. *Plant Molecular Biology*, 1172–1179.
- Frost, C. J., Mescher, M. C., Carlson, J. E., & De Moraes, C. M. (2008). Plant defense priming against herbivores: Getting ready for a different battle. *Plant Physiology*, *146*(3), 818–824. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113027>
- Gimenez-Ibanez, S., & Rathjen, J. P. (2010). The case for the defense: plants versus *Pseudomonas syringae*. *Microbes and Infection*, *12*(6), 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.002>
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and

- Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Gómez, L. M., Teixeira-Silva, N. S., Caserta, R., Takita, M. A., Marques, M. O. M., & de Souza, A. A. (2020). Overexpression of *Citrus reticulata* SAMT in *Nicotiana tabacum* increases MeSA volatilization and decreases *Xylella fastidiosa* symptoms. *Planta*, 252(6), 103. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03511-1>
- He, K., Gou, X., Yuan, T., Lin, H., Asami, T., Yoshida, S., Russell, S. D., & Li, J. (2007). BAK1 and BKK1 Regulate Brassinosteroid-Dependent Growth and Brassinosteroid-Independent Cell-Death Pathways. *Current Biology*, 17(13), 1109–1115. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.036>
- Heiden, A. C., Kobel, K., Langebartels, C., Schuh-Thomas, G., & Wildt, J. (2003). Emissions of oxygenated volatile organic compounds from plants part I: Emissions from lipoxygenase activity. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 45(2), 143–172. <https://doi.org/10.1023/A:1024069605420>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Joshi-Saha, A., Valon, C., & Leung, J. (2011). *PLANT BIOLOGY A Brand New START: Abscisic Acid Perception and Transduction in the Guard Cell*. 4(November 2011). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002164>
- Kim, B. H., Kim, S. Y., & Nam, K. H. (2013). Assessing the diverse functions of BAK1 and its homologs in *Arabidopsis*, beyond BR signaling and PTI responses. *Molecules and Cells*, 35(1), 7–16. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-2255-3>
- Lazazzara, V., Bueschl, C., Parich, A., Pertot, I., Schuhmacher, R., & Perazzolli, M. (2018). Downy mildew symptoms on grapevines can be reduced by volatile organic compounds of resistant genotypes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19776-2>
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. W. (2016). Volatile organic compounds emitted by trichoderma species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40694-016-0025-7>
- Leymarie, J., Vavasseur, A., & Lascève, G. (1998). CO₂ sensing in stomata of *abi1-1* and *abi2-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(7), 539–543. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(98\)80180-0](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80180-0)
- Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E., & Walker, J. C. (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, 110(2), 213–222. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00812-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00812-7)
- 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.
- Locascio, A., Marqués, M. C., García-Martínez, G., Corratgé-Faillie, C., Andrés-Colás, N., Rubio, L., Fernández, J. A., Véry, A. A., Mulet, J. M., & Yenush, L. (2019). BCL2-ASSOCIATED ATHANOGENE4 regulates the KAT1 potassium channel and controls

- Stomatal Movement. *Plant Physiology*, 181(3), 1277–1294. <https://doi.org/10.1104/PP.19.00224>
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Campos, L., Rodrigo, I., Rambla, J. L., Granell, A., Conejero, V., & Bellés, J. M. (2017). A non-targeted metabolomics approach unravels the VOCs associated with the tomato immune response against *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Plant Science*, 8(July), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01188>
- López-Gresa, M. P., Payá, C., Ozáez, M., Rodrigo, I., Conejero, V., Klee, H., Bellés, J. M., & Lisón, P. (2018). A new role for green leaf volatile esters in tomato stomatal defense against *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*. *Frontiers in Plant Science*, 871(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01855>
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(7), 1938–1950. <https://doi.org/10.1105/tpc.022319>
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell*, 126(5), 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>
- Melotto, M., Underwood, W., & Yang He, S. (2008). Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 101–122. <https://doi.org/10.1094/PD-79-1098>
- Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, 51(April), 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>
- Merlot, S., Mustilli, A. C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B., Vavasseur, A., & Giraudat, J. (2002). Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *Plant Journal*, 30(5), 601–609. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01322.x>
- Montillet, J. L., & Hirt, H. (2013). New checkpoints in stomatal defense. *Trends in Plant Science*, 18(6), 295–297. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.03.007>
- Muroi, A., Ramadan, A., Nishihara, M., Yamamoto, M., Ozawa, R., Takabayashi, J., & Arimura, G. (2011). The composite effect of transgenic plant volatiles for acquired immunity to herbivory caused by inter-plant communications. *PloS One*, 6(10), e24594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024594>
- Niinemets, Ü., Kännaste, A., & Copolovici, L. (2013). Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Frontiers in Plant Science*, 4(JUL), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00262>
- Ozáez, M. (2017). Papel defensivo de los compuestos volátiles de hoja verde en plantas de tomate frente a una infección bacteriana. Trabajo Fin de Máster. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas.
- Paschold, A., Halitschke, R., & Baldwin, I. T. (2006). Using “mute” plants to translate volatile signals. *Plant Journal*, 45(2), 275–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02623.x>

- Payá, C., 2017. Estudio del papel defensivo y del mecanismo de acción de los ésteres del (Z)-3-hexenol en plantas de tomate frente a *Pseudomonas syringae*. Trabajo Final de Grado. Universitat Politècnica de Valencia. 57pp.
- Payá, C., Pilar López-Gresa, M., Intrigliolo, D. S., Rodrigo, I., Bellés, J. M., & Lisón, P. (2020). (Z)-3-hexenyl butyrate induces stomata closure and ripening in *Vitis vinifera*. *Agronomy*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy10081122>
- Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762), 808–811. <https://doi.org/10.1126/science.1118510>
- Postel, S., Kűfner, I., Beuter, C., Mazzotta, S., Schwedt, A., Borlotti, A., Halter, T., Kemmerling, B., & Nürnbergger, T. (2010). The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in Arabidopsis development and immunity. *European Journal of Cell Biology*, 89(2–3), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.11.001>
- Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2013). Green leaf volatiles: A plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17781–17811. <https://doi.org/10.3390/ijms140917781>
- Scala, A., Mirabella, R., Mugo, C., Matsui, K., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2013). E-2-hexenal promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* by activating jasmonic acid pathways in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 4(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00074>
- Schwessinger, B., Roux, M., Kadota, Y., Ntoukakis, V., Sklenar, J., Jones, A., & Zipfel, C. (2011). Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genetics*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002046>
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S. C., Nürnbergger, T., Martin, G. B., & Sheen, J. (2008). Bacterial Effectors Target the Common Signaling Partner BAK1 to Disrupt Multiple MAMP Receptor-Signaling Complexes and Impede Plant Immunity. *Cell Host and Microbe*, 4(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.017>
- Shang, Y., Yang, D., Ha, Y., Shin, H. Y., & Nam, K. H. (2020). Receptor-like protein kinases RPK1 and BAK1 sequentially form complexes with the cytoplasmic kinase OST1 to regulate ABA-induced stomatal closure. *Journal of Experimental Botany*, 71(4), 1491–1502. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz489>
- Su, J., Zhang, M., Zhang, L., Sun, T., Liu, Y., Lukowitz, W., Xu, J., & Zhang, S. (2017). Regulation of stomatal immunity by interdependent functions of a pathogen-responsive MPK3/MPK6 cascade and abscisic acid. *Plant Cell*, 29(3), 526–542. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00577>
- ul Hassan, M. N., Zainal, Z., & Ismail, I. (2015). Green leaf volatiles: Biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, 13(6), 727–739. <https://doi.org/10.1111/pbi.12368>
- Wang, Y., Holroyd, G., Hetherington, A. M., & Ng, C. K. Y. (2004). Seeing “cool” and “hot”

- Infrared thermography as a tool for non-invasive, high-throughput screening of *Arabidopsis* guard cell signalling mutants. *Journal of Experimental Botany*, 55(400), 1187–1193. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh135>
- Wenig, M., Ghirardo, A., Sales, J. H., Pabst, E. S., Breitenbach, H. H., Antritter, F., Weber, B., Lange, B., Lenk, M., Cameron, R. K., Schnitzler, J. P., & Vlot, A. C. (2019). Systemic acquired resistance networks amplify airborne defense cues. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11798-2>
- Xin, X. F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: A model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 473–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>
- Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., & Wang, C. (2019). The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01349>
- Yi, H.-S., Heil, M., Adame-Alvarez, R. M., Ballhorn, D. J., & Ryu, C.-M. (2009). Airborne induction and priming of plant defenses against a bacterial pathogen. *Plant Physiology*, 151(4), 2152–2161. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144782>