



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

Estudio del papel del ácido abscísico en el cierre estomático mediado por butanoato de (Z)-3-hexenilo

TRABAJO FIN DE GRADO

Titulación: Biotecnología

Curso: 2020/2021

Valencia, Julio de 2021

Realizado por:

Dña. Magdalena Escánez García

Directoras:

Dña. M^a Purificación Lisón Párraga

Dña. Celia Payá Montes

RESUMEN

Estudio del papel del ácido abscísico en el cierre estomático mediado por butanoato de (Z)-3-hexenilo.

La exposición a diferentes tipos de estrés activa gran cantidad de mecanismos de defensa en las plantas. Estos mecanismos de defensa son de gran complejidad y se basan en la síntesis de compuestos de diferente naturaleza que pretenden sortear los potenciales daños producidos por el estrés. Entre estos metabolitos secundarios implicados en la respuesta defensiva, es posible encontrar algunos de naturaleza volátil, denominados *Volatile Organic Compounds* (VOCs) (Holopainen & Gershenzon, 2010).

En estudios anteriores del laboratorio, mediante un análisis metabolómico, se identificaron algunos de estos VOCs en plantas de tomate infectadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (López-Gresa et al., 2017). Entre todos ellos destacó el butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB), una molécula con capacidad de inducir el cierre estomático y, por ende, proporcionar cierta resistencia a estrés biótico (López-Gresa et al., 2018). Posteriormente, se estudiaron sus propiedades defensivas directas e indirectas y se comenzó a elucidar su mecanismo de acción. De esta manera se descubrió que el HB era independiente del ácido salicílico (SA) y que, además, parecía otorgar cierta tolerancia a la sequía (Payá, 2019). No obstante, en la actualidad, aún se desconoce parte de su modo de acción.

En el presente trabajo, por tanto, se pretende clarificar el modo de acción del HB estudiando el papel de una fitohormona clásicamente implicada en el cierre estomático: el ácido abscísico (ABA). Para ello, se proponen dos experimentos con plantas de tomate mutantes que tienen alterada la ruta de biosíntesis de ABA (*flacca*, *flc*) y su correspondiente parental (Rheinlands Ruhm, RR): (i) el estudio de la respuesta a estrés biótico en plantas tratadas y no tratadas, y (ii) el estudio de la respuesta a la sequía en plantas tratadas y no tratadas. Este diseño experimental permite el estudio de la implicación del ABA en la señalización mediada por HB.

Palabras clave: butanoato de (Z)-3-hexenilo, ácido abscísico, tomate, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *flacca*, Rheinlands Ruhm.

Autora:

Magdalena Escánez García

Directoras:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Celia Payá Montes

ABSTRACT

Analysis of the role of abscisic acid in (Z)-3-hexenyl butanoate-mediated stomatal closure

Exposure to different types of stress activates a large number of defence mechanisms in plants. These defence mechanisms are highly complex and are based on the synthesis of compounds of different nature that aim to avoid the potential damage caused by stress. Among these secondary metabolites involved in the defensive response, it is possible to find some volatile ones, called Volatile Organic Compounds (VOCs) (Holopainen & Gershenzon, 2010).

In previous studies, some of these VOCs were identified in tomato plants infected by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, by means of a metabolomic analysis (López-Gresa et al., 2017). Among them, (Z)-3-hexenyl butanoate (HB) was the one which showed a greater physiologic change. This molecule was able to induce stomatal closure and, thus, provide some resistance to biotic stresses (López-Gresa et al., 2018). Subsequently, its direct and indirect defensive properties were studied and its mechanism of action started to be investigated. In this way, it was discovered that HB was independent of salicylic acid (SA) and it was also able to confer drought tolerance (Payá, 2019). However, part of its mode of action is still unknown nowadays.

Therefore, the aim of this project is to clarify the mode of action of HB by studying the role of a phytohormone classically involved in stomatal closure: abscisic acid (ABA). For this purpose, two experiments with mutant tomato plants (*flacca*, *flc*) are proposed: (i) the study of the response to biotic stress in treated and untreated plants, and (ii) the study of the response to drought in treated and untreated plants. As a result, this project will allow revealing the implication of ABA in the HB signaling.

Key words: (Z)-3-hexenyl butanoate, abscisic acid, tomato, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *flacca*, Rheinlands Ruhm.

Auhtor:

Magdalena Escáñez García

Directors:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Celia Payá Montes

AGRADECIMIENTOS

No puedo empezar de otra forma que no sea dándole las gracias a la persona que más me ha enseñado y apoyado desde que entré por la puerta del 2.02. Celia, sabes que me faltan palabras -y, a la vez, sobran- para decirte todo lo que has supuesto para mí. Gracias por ser mucho más que mi guía en el laboratorio y convertirme poco a poco en mi amiga. Gracias por llevarme en coche siempre que ha llovido, literal y metafóricamente. Eres increíble y no me cabe duda de que, estés donde estés, lo vas a “petar”. Te veo en el spa.

Gracias también a cada una de las personas que me he cruzado en el IBMCP. Gracias a Puri y a Mapi por haber depositado tanta confianza en mí y por haberme hecho sentir como en casa. Gracias a Paco por ser puro rigor y estar siempre disponible para ayudar y mejorar el trabajo de todos; ha sido un placer aprender de ti. Gracias a Ismael por despertar en mí la curiosidad necesaria para sumergirme en el mundo de la bioquímica de las plantas y por enseñarme que la pasión por lo que se hace es algo que nunca deberíamos perder. Gracias a Leti por ser mi apoyo musical incondicional y gracias, también, a José María Bellés por inundar el laboratorio con sus volátiles de mandarina y su vitalidad. Gracias a todos, ha sido genial aprender de todos vosotros.

También me gustaría agradecer a mis compañeros por estar siempre ahí, codo con codo y por sacarme las placas de las qPCR. Fran, Julia y Paula, ha sido un placer hablar de cualquier cosa y descubrir un poquito de vosotros. Sois puro arte, tolerancia y humanidad, y me encanta.

Gracias, por supuesto, a esos amigos que me han ayudado a construirme tanto académica como personalmente. A esos que han ido dando los pasitos conmigo, enseñándome tantas cosas y queriéndome tan bien. Vais a ser excelentes científicos y os voy a ver triunfar, lo sé.

Por último, quería agradecer a esas personas que me han apoyado desde fuera del ámbito académico y que han soportado mi autoexigencia y sus consecuentes dramas. Bendita paciencia. Gracias a Nacho, a Luis y a Iván por apoyarme en todo; sé que siempre estáis. Gracias a Víctor por haberme escuchado hablar durante horas sobre temas que no comprendía y por vivir conmigo todas mis pasiones, nadie me habría acompañado mejor. Y, como no, gracias a mis padres y a mi hermana que, a 400 kilómetros, han sabido darme el calor del hogar. Gracias por sentir conmigo, por creer en mí y por poner todos los adoquines del camino. Os quiero.

ÍNDICE GENERAL

1	Introducción.....	1
1.1	Respuesta defensiva de las plantas	1
1.1.1	Defensa de las plantas ante un estrés biótico: tipos de respuesta	1
1.1.2	Modelo de estudio: la respuesta defensiva de las plantas tras la infección de <i>Pseudomonas Syringae pv tomato</i> DC3000	4
1.2	Respuesta a estrés de tipo abiótico	4
1.2.1	Estrés hídrico: sequía	5
1.3	Importancia del cierre estomático en la respuesta defensiva	6
1.3.1	La respuesta defensiva y el ABA	6
1.4	El papel de los compuestos volátiles en el sistema defensivo de las plantas	8
1.4.1	Green Leaf Volatiles (GLVs).....	8
1.4.2	Butanoato de Z-3-hexenilo	10
2	Objetivos.....	12
3	Materiales y Métodos.....	13
3.1	Material vegetal y condiciones de cultivo.....	13
3.1.1	Esterilización y germinación de semillas.....	13
3.1.2	Condiciones de cultivo.....	13
3.2	Tratamiento con butanoato de (Z)-3-hexenilo	13
3.2.1	Tratamiento en cámaras de metacrilato	14
3.2.2	Tratamiento mediante pulverización en diferentes genotipos de <i>Solanum Lycopersicum</i> expuestos a condiciones distintas	14
3.3	Material microbiológico, infección y conteo	14
3.3.1	Preparación del inóculo bacteriano	15
3.3.2	Infección bacteriana	15
3.3.3	Conteo bacteriano	15
3.4	Análisis fenotípico: altura y peso	15
3.5	Medidas de apertura estomática.....	16
3.6	Toma de muestra.....	16
3.7	Análisis cuantitativo de transcritos mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	16
3.7.1	Extracción del RNA total, precipitación y cuantificación.....	16
3.7.2	Retrotranscripción	17
3.7.3	Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)	17
3.8	Análisis estadístico.....	18
4	Resultados y discusión.....	19
4.1	Mecanismos de acción del butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB).....	19

4.1.1	Modo de acción del HB en la inducción de resistencia frente a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato DC3000</i>	19
4.1.2	Modo de acción del HB en la inducción de tolerancia al estrés hídrico.....	24
4.2	Perspectivas futuras	29
5	Conclusiones	31
6	Bibliografía	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1. Respuesta fisiológica y celular inducida por la presencia de patrones moleculares (MAMPs y DAMPs) en plantas. Los PRRs perciben los patrones moleculares y reclutan a los correceptores, provocando una serie de eventos celulares de distinto tipo. El complejo PRR y los receptores de tipo quinasa citoplasmática son fosforilados, lo cual activa la cascada de quinasas (MAPK) y las quinasas dependientes de calcio (CDPKs). Los efectos principales de la inmunidad inducida por patrones (PTI) son: entrada de calcio al citoplasma, salida de iones al espacio extracelular, remodelación de los filamentos de actina, cierre estomático y de plasmodesmos (PD), deposición de callosa y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), ácido fosfatídico (PA), fitoalexinas y fitohormonas (Yu et al., 2017) 2

Figura 1. 2. Ilustración esquemática de la respuesta de las plantas a estrés hídrico. El estrés hídrico provoca diversas respuestas: cierre estomático (stomata), activación de mecanismos para la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS), cambios metabólicos (metabolic adjustment) y fotosintéticos. Estas variaciones en la fisiología foliar conllevan cambios en la tasa de crecimiento y multiplicación celular, en el intento de adaptarse y sobrevivir (Osakabe et al., 2014). 5

Figura 1. 3. Esquema del cierre estomático inducido bajo condiciones de estrés abiótico o biótico. Las respuestas producidas por un estrés biótico y abiótico poseen muchos mecanismos comunes debido a la acumulación de ABA. ABA eleva los niveles de ROS, NO y Ca^{2+} en la célula. Estos tres mensajeros secundarios inducen el cierre estomático mediante una serie de eventos que conllevan la expulsión iónica y la pérdida de turgencia de las células de guarda. La retención de agua debida al cierre estomático otorga cierta tolerancia a la sequía y, en paralelo, evita la introducción de patógenos. Además, las ROS, el NO y el Ca^{2+} inducen otras respuestas adaptativas como la HR, la muerte celular programada o cambios transcripcionales. Por ello, estos mensajeros secundarios se consideran reguladores vitales y esenciales en la respuesta estomática mediada por ABA (Bharath et al., 2021). 8

Figura 1. 4. Resumen de las funciones de los GLVs frente a la exposición de diferentes tipos de estrés. Los estímulos inductores de la producción de GLVs se representan en color rojo y las funciones de estos, en negro (Ameye et al., 2018). 9

Figura 3. 1. Esquema del diseño experimental expuesto en el presente trabajo. 14

Figura 4. 1. Foto de plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (A) y flacca (B) de 4 semanas de edad cultivadas en las mismas condiciones. 20

Figura 4. 2. Efecto del butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) en el ratio de apertura estomática en plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (flc). Medida de la apertura estomática de plantas tratadas con HB (+HB) o con H_2O (-HB). Se llevó a cabo un experimento independiente con 4 réplicas biológicas y los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de las mismas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA bidireccional, que proporcionó información sobre las diferencias significativas de cada uno de los grupos analizados, considerando un p-value < 0.05. Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro..... 20

Figura 4. 3. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* en hojas de plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (flc) tras un tratamiento con HB (+HB) o H₂O (-HB). La recogida y procesamiento de las muestras foliares se llevó a cabo 24 horas después de la infección. Se llevó a cabo un experimento independiente con 4 réplicas biológicas y los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de las mismas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA bidireccional, que proporcionó información sobre las diferencias significativas de cada uno de los grupos analizados, considerando un p-value < 0.05. Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro. 21

Figura 4. 4. Expresión de los genes PR1 (A), SLAC1 (B) y MYB44 (C) en plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (flc) tratadas (+HB) o no tratadas (-HB) con butanoato de (Z)-3-hexenilo. Estos niveles de expresión se midieron en hojas de plantas de tomate expuestas a tratamiento o no de HB durante 24 horas en cajas de metacrilato. De este ensayo se hizo un experimento independiente con 4 réplicas biológicas. Los valores representados corresponden al promedio de la expresión relativa (con respecto al gen endógeno actina) \pm el error estándar de las réplicas biológicas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA bidireccional, considerando un p-value < 0.05. Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro. La ausencia de letras en las representaciones indica que no existen diferencias significativas..... 23

Figura 4. 5. Peso (A) y altura (B) en plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (flc) en condiciones de riego (H₂O) o sequía (Sequía) tratadas (+HB) o no tratadas (-HB) con butanoato de (Z)-3-hexenilo. Tanto la altura como el peso se midieron descartando la parte radicular de la planta. De este ensayo se hicieron cuatro experimentos independiente con 8 réplicas biológicas. Los resultados mostrados en los gráficos pertenecen a uno de los experimentos, siendo sus valores representativos de los demás. Los valores representados corresponden al promedio del peso y de la altura \pm el error estándar de las réplicas biológicas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA de tres factores, considerando un p-value < 0.05. Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro. 24

Figura 4. 6 Ratios de retención de agua en plantas de cada genotipo y tratamiento..... 25

Figura 4. 7. Efecto del butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) en el ratio de apertura estomática en plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (flc) en condiciones de riego (H₂O) y estrés hídrico (Sequía). Medida de la apertura estomática de plantas tratadas con HB o con H₂O (control) en riego y sequía. Se llevaron a cabo cuatro experimentos independientes con 4 réplicas biológicas. Los resultados mostrados en los gráficos pertenecen a uno de los experimentos, siendo sus valores representativos de los demás. Se representa la media del ratio de apertura estomática \pm el error estándar de las réplicas biológicas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA de tres factores, que proporcionó información sobre las diferencias significativas de cada uno de los grupos analizados, considerando un p-value < 0.05. Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro. 27

Figura 4. 8. Expresión de los genes LEA (A), SLAC1 (B) y MYB44 (C) en plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (flc) tratadas (+HB) o no tratadas (-HB) con butanoato de (Z)-3-hexenilo, en condiciones de riego (H₂O) y estrés hídrico (Sequía). De este ensayo se hicieron 4 experimentos independientes con 4 réplicas biológicas. Los resultados mostrados en los gráficos pertenecen a uno de los experimentos, siendo sus valores representativos de los demás. Los valores representados corresponden al promedio de la expresión relativa (con

respecto al gen endógeno actina) \pm el error estándar de las réplicas biológicas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA de tres factores, considerando un p-value < 0.05 . Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro. La ausencia de letras en las representaciones indica que no existen diferencias significativas..... 28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3. 1. Oligonucleótidos seleccionados como cebadores para la amplificación (RT-qPCRs). 18

Tabla 4. 1. Cálculo del ratio de la retención de agua (en gramos) en plantas de cada genotipo y tratamiento. El cálculo se llevó a cabo dividiendo el peso promedio de las plantas en sequía entre el peso promedio de las plantas en riego, para cada uno de los genotipos y tratamientos. 25

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: Ácido Abscísico

Avr: Factor de avirulencia

CFU: Unidades formadoras de colonias

DAMPs: *Damage-Associated Molecular Patterns*

ET: Etileno

ETI: *Effector-Triggered Immunity*

ETS: *Effector-Triggered Susceptibility*

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

GLVs: *Green Leaf Volatiles*

HB: Butanoato de (Z)-3-hexenilo

HR: Hypersensitive Reaction

ISR: *Induced-Systemic Resistance*

JA: Ácido Jasmónico

LEA: *Late Embryogenesis Abundant*

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

MAMPs: *Microbe-Associated Molecular Patterns*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MeSA: Ácido Metilsalicílico

MJ: Metil jasmonato

MM: MoneyMaker

NB-LRR: *Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat*

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

Pip: Ácido Pipecólico

PM-PRRs: *Plasma Membrane-Pattern Recognition Receptors*

PRRs: *Pattern Recognition Receptors*

PRs: *Pathogenesis-Related Proteins*

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

PTI: *PAMP Triggered Immunity*

pv.: *Patovar*

R: Gen de resistencia

ROS: *Reactive Oxygen Species*

SA: *Ácido Salicílico*

SAR: *Systemic Acquired Resistance*

VOCs: *Volatile Organic Compounds*

1 INTRODUCCIÓN

1.1 RESPUESTA DEFENSIVA DE LAS PLANTAS

Como todos los seres vivos, las plantas están expuestas a múltiples estímulos de distinta naturaleza, frente a los cuales son capaces de reaccionar. Debido a su naturaleza sésil, las plantas se han visto obligadas a desarrollar “sistemas de defensa” a varios niveles, lo cual les permite elaborar respuestas congruentes con el entorno. Así, cuando los estímulos recibidos pueden suponer un estrés, se activan ciertos mecanismos con el objetivo de sortear un posible daño. El estrés puede de ser de carácter biótico, si el responsable del estrés es un ser vivo, o abiótico, si implica cambios en las condiciones ambientales.

1.1.1 Defensa de las plantas ante un estrés biótico: tipos de respuesta

El estrés biótico puede ser producido por seres vivos de diferente índole, los cuales disparan mecanismos de defensa distintos en función de la interacción que establecen con la planta. Por ello, los herbívoros que provocan daños mecánicos inducen un tipo de respuesta diferente a los microorganismos (bacterias, hongos, virus y viroides) que colonizan los diferentes tejidos del hospedador. Gracias a esta especificidad en la defensa, en múltiples ocasiones, las amenazas son contrarrestadas y los procesos homeostáticos de la planta aseguran su supervivencia.

Para intentar comprender las diferentes armas que participan en la respuesta defensiva tras interacción planta-patógeno, es posible realizar clasificaciones atendiendo a diversos factores.

Es importante, en primer lugar, distinguir entre los elementos defensivos que se encuentran de manera constitutiva en la planta y los que son inducidos tras la interacción, con los diferentes tipos de patógenos. La defensa constitutiva hace referencia a elementos que orquestan la resistencia pasiva de la planta, es decir, a las barreras físicas (cutícula, la pared celular, los tricomas...) y químicas (compuestos fenólicos, terpenoides, alcaloides...) que dificultan la propia interacción con el patógeno. Estas sustancias químicas presentes de forma independiente al patógeno se conocen como “metabolitos secundarios” y resultan ser directamente tóxicos con los “atacantes”. En contraposición, la defensa inducida tras la interacción -o resistencia activa- se dispara debido a la detección de moléculas que se reconocen como elementos asociados al ser vivo causante del estrés o al propio daño. Estas moléculas inductoras de la respuesta defensiva se conocen como *elicitores* y, dependiendo de su naturaleza, activan distintas vías de señalización.

A su vez, la respuesta inducida puede clasificarse en respuestas local y sistémica en función de su alcance. Dentro de la respuesta local, cabe destacar dos rutas principales: la activada por la detección de PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y MAMPS (*Microbe-Associated Molecular Patterns*), conocida como *PAMP Triggered Immunity* (PTI) y la activada por la presencia de moléculas efectoras producidas por el patógeno, es decir, *Effector-Triggered Immunity* (ETI).

1.1.1.1 Respuestas locales

El primer nivel de lo conocido como inmunidad activa de la planta es la respuesta inducida por la detección de moléculas asociadas a patógenos (PTI). Esta se produce cuando los *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) detectan la presencia de PAMPs o MAMPS, es decir, patrones asociados a microorganismos que pueden ser (o no) patogénicos. Además de los susodichos patrones asociados a agentes externos, existen moléculas asociadas al daño del huésped (*Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMPs), las cuales también tienen un papel esencial en este tipo de inmunidad. Asimismo, la detección de DAMPs se encuentra supeditada a PRRs que

se localizan en la membrana plasmática (PM-PRRs). Al ser inductores de la respuesta inmune, tanto los MAMPs/PAMPs como los DAMPs se consideran *elicitors*.

La detección de este tipo de patrones moleculares desencadena una serie de eventos que se considera característica de la PTI, como alteraciones de la pared celular o la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), que actúan haciendo más tóxico el microambiente y señalizando el daño. Otras respuestas englobadas en este tipo de resistencia son la producción de fitoalexinas, la activación de cascadas de quinasas (MAPK) o la señalización mediante la entrada al citosol de calcio extracelular (Figura 1.1.) (Yu et al., 2017)

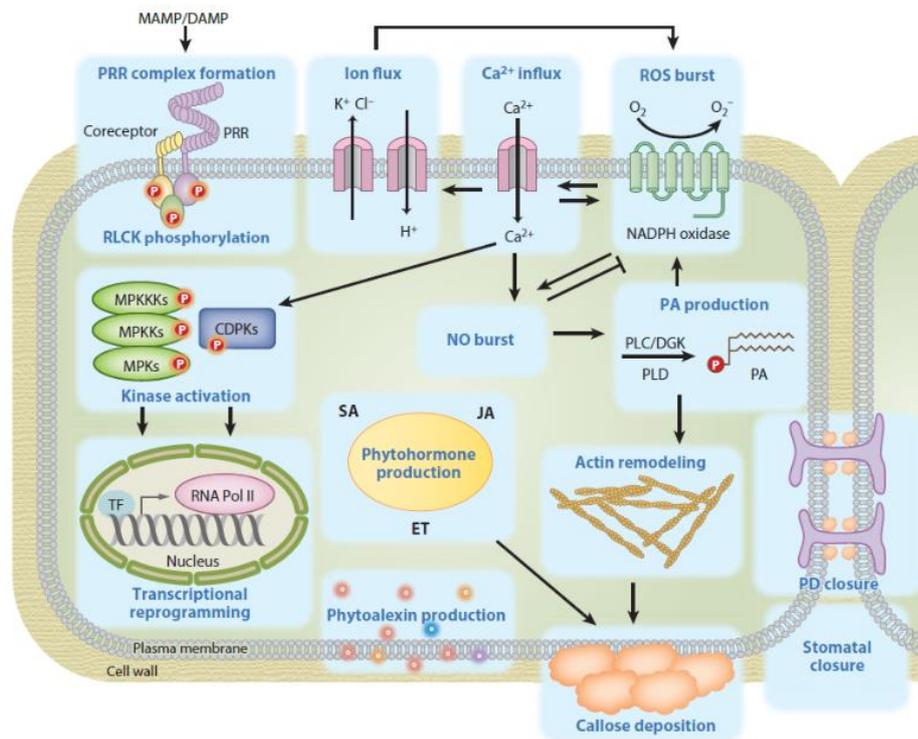


Figura 1. 1. Respuesta fisiológica y celular inducida por la presencia de patrones moleculares (MAMPs y DAMPs) en plantas. Los PRRs perciben los patrones moleculares y reclutan a los correceptores, provocando una serie de eventos celulares de distinto tipo. El complejo PRR y los receptores de tipo quinasa citoplasmática son fosforilados, lo cual activa la cascada de quinasas (MAPK) y las quinasas dependientes de calcio (CDPKs). Los efectos principales de la inmunidad inducida por patrones (PTI) son: entrada de calcio al citoplasma, salida de iones al espacio extracelular, remodelación de los filamentos de actina, cierre estomático y de plasmodesmos (PD), deposición de calosa y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), ácido fosfatídico (PA), fitoalexinas y fitohormonas (Yu et al., 2017)

En ocasiones, ante las primeras líneas de defensa de la planta, ciertos microorganismos son capaces de producir lo que se conoce como “efectores”, que tienen como objetivo esquivar o bloquear la respuesta inmune del huésped. Si estas proteínas efectoras son reconocidas por receptores específicos codificados por genes de resistencia (gen *R*), se dispara la resistencia derivada de la presencia de efectores (*Effector Triggered Immunity*, ETI). En este proceso se dan interacciones entre las proteínas codificadas por genes *R* y efectores del microorganismo, con la finalidad de generar cambios -sobre todo de tipo transcripcional- que eviten la expansión del microorganismo y, por ende, de la enfermedad.

Las proteínas *R* poseen, en su mayoría, dos dominios esenciales (*nucleotide binding-leucine rich repeat*, NB-LRR) que, mediante mecanismos complejos, son capaces de detectar los efectores. Así, cuando un efector es detectado por su correspondiente proteína *R*, se le conoce como proteína de “avirulencia” (*Avirulence genes*, *Avr*) y, en consecuencia, se considera que el

microrganismo infectante no es virulento porque no es capaz de expandirse y causar una enfermedad. Esta interacción se considera específica entre el huésped y el microbio, por lo que se suele denominar “resistencia específica de raza”. Como resultado de esto, se inducen respuestas de hipersensibilidad (*Hypersensitive Response*, HR) rápidas, que provocan la necrosis del tejido y aíslan la infección. Este tipo de interacción denominada *interacción de tipo incompatible* conlleva la reprogramación transcripcional que asegura la adaptación de la planta frente a la infección y promueve la acumulación de ácido salicílico (SA) que, además, induce el desarrollo de la resistencia sistémica (SAR, *Systemic Acquired Resistance*).

Cuando este mecanismo no funciona porque no es posible el reconocimiento de los efectores del patógeno, ocurre un fenómeno que se conoce como “interacción compatible”, que resulta en el desarrollo de síntomas en el huésped. Cuando esto sucede, la planta es incapaz de reaccionar de forma contundente ante esta amenaza y puede acabar muriendo (*Effector Triggered Susceptibility*, ETS), (Wu et al., 2014).

1.1.1.2 Respuestas sistémicas

La resistencia sistémica se dispara con la acumulación de compuestos tales como las especies reactivas del oxígeno (ROS), el SA o las fitoalexinas. Algunos de los compuestos producidos en la respuesta local son móviles, es decir, tienen la posibilidad de viajar a través del floema y alcanzar tejidos no infectados, previniéndolos de la infección y generando cambios en su bioquímica y su fisiología. Otras moléculas implicadas en la expansión de la respuesta sistémica son los compuestos orgánicos volátiles (*Volatile Organic Compounds*, VOCs), capaces de alcanzar otras partes de la planta mediante su secreción al ambiente e, incluso, pudiendo llegar a plantas colindantes. La resistencia sistémica puede dividirse en la adquirida y la inducida (SAR y ISR).

La resistencia sistémica adquirida (SAR) se activa cuando hay infección por microorganismos o por hongos biótrofos. Se ha observado que este tipo de resistencia otorga a la planta cierta “memoria”, es decir, confiere la capacidad de reaccionar de forma más rápida y efectiva, una vez ha sido huésped de un determinado microorganismo. Asimismo, esta resistencia sistémica resulta ser de larga duración y de amplio espectro, por lo que tiene un efecto protector frente a una amplia gama de microorganismos durante días, meses e, incluso, estaciones completas. El desarrollo de esta respuesta inmune está asociado a un aumento del ácido salicílico, principalmente. No obstante, se ha visto que otras señales también parecen ser relevantes para el correcto desarrollo de la resistencia: el aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la señalización lipídica. En su conjunto, todos estos sucesos inducirían la expresión de genes relacionados con la patogénesis (*Pathogenesis-Related proteins*, PR) en tejidos distales no infectados. Es por esto por lo que este tipo de genes se suelen utilizar como marcadores moleculares cuando se pretende comprobar la presencia de una respuesta defensiva, entre los que cabe destacar los genes *PR1*, *PR2* y *PR5* (Bektas & Eulgem, 2015). No obstante, en los últimos años, se ha observado que la presencia de estas proteínas no explica por sí sola que se esté desarrollando este tipo de resistencia (Conrath, 2006).

A pesar de que esta respuesta está asociada a la acumulación de ácido salicílico, esta no es una molécula móvil capaz de desplazarse por el floema, por lo que de la expansión de la resistencia sistémica se encargan otras moléculas, tales como el ácido metilsalicílico (MeSA), el ácido azelaico, el glicerol-3-fosfato, el ácido jasmónico (JA) y el ácido piperónico (Pip). Por ello, estos compuestos y sus análogos estructurales tienen gran interés y se estudian como potenciales *elicitors* (Maffei et al., 2012).

Por otro lado, la resistencia sistémica inducida (ISR) es, normalmente, producida por necrótrofos. Estos patógenos no producen necrosis local del tejido, por lo que este tipo de resistencia se caracteriza por estar asociada a las rutas del ácido jasmónico y el etileno. Por último, infecciones relacionadas con los insectos dispararían la ruta del ácido abscísico (ABA), (Bektas & Eulgem, 2015).

1.1.2 Modelo de estudio: la respuesta defensiva de las plantas tras la infección de *Pseudomonas Syringae pv tomato* DC3000

Con el objetivo de estudiar la respuesta defensiva de las plantas y establecer un esquema general de la interacción planta-patógeno, se han hecho múltiples estudios con infinidad de fitopatógenos y cultivos. No obstante, es usual que exista cierta dominancia de algunos modelos, debido a su sencillo desarrollo y uso en el laboratorio, a la posibilidad de extrapolación o a la importancia económica que supone la obtención de información en ese ámbito. *Pseudomonas Syringae* se ha convertido en un microorganismo profundamente analizado por esto mismo, ya que existen alrededor de 48 patovares de esta bacteria gram-negativa; grupos que se establecen por el número de plantas taxonómicamente diferentes que es capaz de infectar (Gardan, et al., 1999; Katagiri, Thilmony, & He, 2002).

La infección por este tipo de bacteria -con flagelos en disposición polar y de forma bacilar- consta de dos fases: el crecimiento en la superficie de la planta (es una bacteria epífita) y la introducción a través estomas o heridas presentes en las partes aéreas de la misma, provocando daños de tipo necrótico en la hoja -rodeados de un halo clorótico difuso- (Hirano & Upper, 2000; Katagiri, Thilmony, & He, 2002).

Concretamente, *Pseudomonas syringae* patovar *tomato* DC3000 (Pst) es una cepa patogénica en *Arabidopsis* y en tomate, causando grandes pérdidas en estos cultivos. Al principio, este patógeno se documentó como exclusivo de tomate (lo cual es importante *per se* debido a la relevancia económica de este cultivo) pero, posteriormente, se observó que también infectaba a *Arabidopsis*, “la planta modelo por excelencia”. Además, la especificidad que presentaban los patovares de *Pseudomonas syringae* favoreció el estudio de esta cepa y la hizo esencial para la comprensión de la interacción planta-patógeno (Katagiri et al., 2002).

1.2 RESPUESTA A ESTRÉS DE TIPO ABIÓTICO

El estrés de tipo abiótico es provocado por condiciones adversas del medio que causan cambios fisiológicos en las plantas, de manera que pueden llegar a provocar una inhibición, más o menos acusada, del crecimiento vegetativo (acumulación de biomasa), del desarrollo reproductivo o de la productividad agrícola, llegando, incluso, a ocasionar la muerte de la planta. Son muchas las condiciones ambientales que pueden causar estrés en una planta: la sequía, la salinidad del suelo, las temperaturas subóptimas, los suelos ácidos o alcalinos, las inundaciones, la radiación excesiva, la presencia de metales pesados en el suelo o el daño mecánico producido por inclemencias meteorológicas. En la actualidad, los estreses abióticos son una preocupación vigente tanto en la agricultura como en la sociedad general, pues son la causa de grandes pérdidas en la productividad de las cosechas y una de las consecuencias más tangibles del cambio climático. De hecho, el incremento de la población y el miedo al desabastecimiento derivado de pérdida de productividad por el empobrecimiento del suelo o las condiciones climáticas son problemas que consideran de total prioridad en convenciones intergubernamentales, siendo esencial su estudio en profundidad (Ciais et al., 2005).

La dificultad que presenta el estudio de los estreses de tipo abiótico es el solapamiento de la señalización y la respuesta de diferentes estímulos, es decir, estreses abióticos de diferente naturaleza provocan cambios fisiológicos similares en la planta. De hecho, un estímulo producido por una determinada condición ambiental puede provocar diversos tipos de estrés en la planta y, de la misma forma, dos condiciones ambientales diferentes pueden llegar a provocar el mismo tipo de estrés. De esta manera, la sequía y la elevada salinidad del suelo provocan un estrés osmótico en la planta y, además, la sequía produce lo que se conoce como estrés oxidativo, un efecto también inducido por una infección bacteriana. Estos solapamientos pueden llegar a hacer complicado el estudio de las respuestas frente a estos estímulos y hace necesario recurrir a estrategias *ómicas*, como la genómica o la transcriptómica (Hirayama & Shinozaki, 2010).

1.2.1 Estrés hídrico: sequía

Una planta sufre estrés hídrico cuando está expuesta a condiciones de sequía, una elevada salinidad del suelo o temperaturas excesivamente bajas. Dada su naturaleza sésil, las plantas elaboran respuestas bioquímicas y fisiológicas complejas que buscan la adaptación y la supervivencia del individuo en las condiciones ambientales que la envuelven. Los primeros signos de estrés hídrico son la pérdida de agua y, por tanto, de turgencia de la planta, lo cual promueve el cierre de estomas y la acumulación de ABA, una hormona de relevancia en la tolerancia a este tipo de estrés, entre otros (Figura 1.2.). Por otro lado, los mecanismos de la respuesta al estrés hídrico implican la producción de osmolitos y la inducción de genes codificantes de las acuaporinas, las proteínas LEA y las proteínas PR.

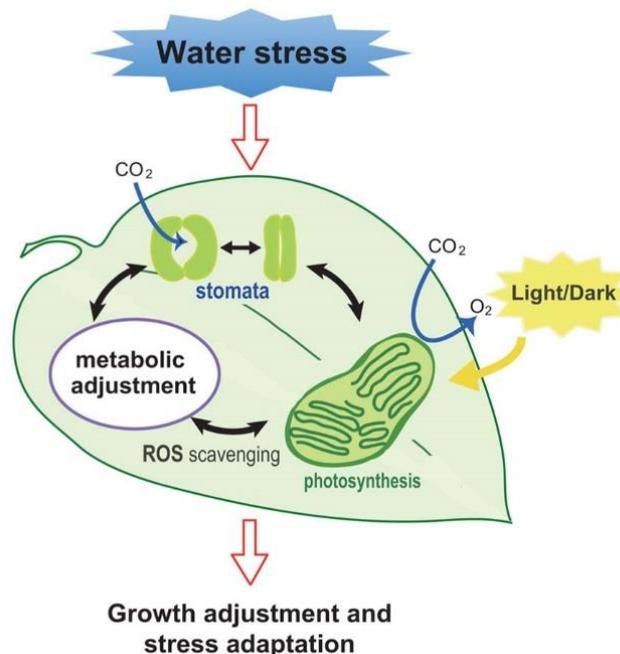


Figura 1. 2. Ilustración esquemática de la respuesta de las plantas a estrés hídrico. El estrés hídrico provoca diversas respuestas: cierre estomático (*stomata*), activación de mecanismos para la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS), cambios metabólicos (*metabolic adjustment*) y fotosintéticos. Estas variaciones en la fisiología foliar conllevan cambios en la tasa de crecimiento y multiplicación celular, en el intento de adaptarse y sobrevivir (Osakabe et al., 2014).

La acumulación de osmolitos es una de las respuestas más tempranas e inmediatas, pues siempre hay un nivel basal de osmolitos susceptible de incrementarse. Esto es así porque estas moléculas de diversa naturaleza, además de contribuir al balance osmótico, tienen como función la protección directa de macromoléculas (son osmoprotectores de las membranas celulares y las proteínas) y la inactivación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) derivadas del estrés oxidativo asociado al propio estrés hídrico y a la acumulación de ABA (Osakabe et al., 2014; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

En contraste, la inducción de la transcripción de determinados genes es una respuesta más progresiva y lenta, algunas veces dada por la propia acumulación de ABA. Entre los genes más relevantes en la respuesta transcripcional están aquellos que codifican las acuaporinas (*PIP*, *TIP*, *NIP* y *SIP*), proteínas de morfología cilíndrica que actúan como canales de agua en la membrana plasmática y el tonoplasto (Maurel et al., 2002).

También son de gran importancia los genes que codifican para proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant proteins*) cuya presencia es común en la semilla, durante las últimas etapas de la embriogénesis, cuando esta comienza a desecarse. Esta deshidratación propia del desarrollo habitual promueve la biosíntesis de estas proteínas, que protegen el tejido mediante la combinación con moléculas de agua (minimiza la pérdida de agua intracelular), la estabilización de macromoléculas (membranas y proteínas) y la unión a iones para proteger el metabolismo citosólico. Asimismo, la acumulación de moléculas de este tipo también ocurre en tejidos vegetativos cuando se produce una deshidratación por una exposición a sequía (Dure et al., 1989).

Otra de las proteínas principalmente asociadas a la tolerancia a estrés hídrico es la osmotina. La osmotina es una proteína sencilla cuya expresión se induce por la acumulación de ABA y parece ser responsable de la síntesis de ciertos solutos clave en el restablecimiento del equilibrio osmótico. Además, se cree que podría estar implicada en ciertos cambios metabólicos y estructurales de las células vegetales (Barthakur et al., 2001; Grillo et al., 1995).

1.3 IMPORTANCIA DEL CIERRE ESTOMÁTICO EN LA RESPUESTA DEFENSIVA

Los estomas son estructuras celulares esenciales en la homeostasis de las plantas, pues su buen funcionamiento es clave para procesos fisiológicos tan habituales como control de la transpiración. Estas aperturas naturales de la planta, además, tienen una gran relevancia en los procedimientos generados como respuesta a diferentes tipos de estrés, y es que la respuesta estomática es una de las primeras líneas de defensa que posee la planta. La regulación del cierre estomático es altamente compleja, pues existen una gran variedad de mecanismos y rutas bioquímicas que producen efectos análogos y que son activados por diferentes estímulos.

El cierre estomático derivado de la detección de estímulos causantes de estrés es normalmente mediado por ABA, una hormona acumulada, habitualmente, en condiciones tanto de estrés abiótico como de estrés biótico. Entre los efectos de ABA en las hojas, es importante destacar la reducción en la tasa de transpiración como consecuencia del cierre estomático, lo cual evita la pérdida de agua a través de los estomas y limita la entrada de patógenos a través de estas estructuras. Además, esta fitohormona es capaz de interactuar con otras moléculas como el metil jasmonato (MJ) o el ácido salicílico, mejorando la adaptación de las plantas a un entorno hostil (Bharath et al., 2021).

1.3.1 La respuesta defensiva y el ABA

Las plantas acumulan hormonas y *elicitors* como consecuencia de la presencia de estreses abiótico y biótico. Entre las hormonas acumuladas destaca ABA, ya que es una hormona versátil que está implicada en respuestas de defensa a ambos tipos de estrés. Otras hormonas, en contraste, son asociadas únicamente a la respuesta ante un tipo determinado de estrés, como el SA el MJ y el ET, que están esencialmente implicadas en las respuestas a estrés biótico.

En condiciones de sequía, salinidad o bajas temperaturas, la acumulación de ABA promueve el cierre estomático para retener agua mientras otras respuestas más progresivas, como la inducción de genes relacionados con el ajuste osmótico, tienen lugar. De la misma manera, otros compuestos capaces de inducir el cierre estomático o la transcripción de genes necesitan de la acumulación de ABA para ser realmente efectivos (Bharath et al., 2021).

1.3.1.1 Estrés biótico, ABA y cierre estomático

De la misma forma que ocurre con la sequía, se ha descrito un aumento en las concentraciones de ABA con la infección de patógenos. No obstante, en este caso, resulta más complejo correlacionar el incremento de los niveles de ABA con la resistencia/susceptibilidad que presenta el huésped ante el patógeno, pues esta respuesta depende de muchos más factores (la

presencia de otro tipo de estrés, la duración de la infección o el tipo de patógeno condicionan la acumulación de ABA en la planta). Sin embargo, sí se ha observado que, en las primeras etapas de la infección, el incremento de la concentración de ABA induce cierta resistencia, mientras que en las últimas etapas, una presencia excesiva de ABA hace más susceptible la planta a la expansión de la infección (Bharath et al., 2021).

La sucesión de eventos que tiene lugar como consecuencia de una infección comienza con la detección de *elicitors* externos (MAMPs) o endógenos (DAMPs y hormonas como el SA o el MJ). Eso promueve la síntesis y movilización de ABA. Una vez dentro de la célula, se ha observado que ABA estimula la señalización que promueve la producción de ROS, lo cual induce, a su vez, el incremento de Ca^{2+} citosólico. Como consecuencia de esto, diferentes canales aniónicos -entre los que destaca *SLAC1*- son activados con el objetivo de forzar la expulsión de aniones, provocando una despolarización de la membrana plasmática. Este cambio en el potencial celular conlleva una expulsión de K^+ hacia el medio extracelular, de manera que se produce un descenso en la turgencia de las células guarda y, como resultado, se cierra el estoma. Esta sucesión de eventos sugieren que la regulación estomática por parte de ABA es compleja pero directa y, por ello, su presencia es clave para que una planta sea tolerante a la sequía (Bharath et al., 2021; Osakabe et al., 2014).

1.3.1.1 Estrés hídrico, ABA y cierre estomático

Cuando existen estrés hídrico, una de las primeras respuestas de la planta es la acumulación de ABA en las raíces, seguido de un aumento en la concentración de esta misma hormona en las hojas. Este aumento de ABA en las hojas es consecuencia del transporte del ABA sintetizado en las raíces a través del tejido vascular y conlleva una restricción de la tasa de transpiración, regulando de esta manera el potencial hídrico (Bharath et al., 2021).

Concretamente, el ABA es transportado a las células de guarda mediante difusión pasiva como respuesta a cambios en el pH y mediante transportadores específicos como ABCG₂₅, ABCG₄₀ y AIT1/NRT1.2/NPF_{4,6}. Se ha visto que estos transportadores específicos son de gran importancia en la regulación estomática, pues la mutación de alguno de ellos conlleva una mayor susceptibilidad a estrés hídrico. Por un lado, la transcripción de ABCG₂₅ y de AIT1/NRT1.2/NPF_{4,6} se ha visto que es inducida por la presencia de ABA en condiciones de sequía y que, además, es específica del tejido vascular. En contraste, se ha visto que ABCG₄₀ se expresa en las células guarda y parece importar el ABA desde el tejido vascular hacia el interior de estas células (Osakabe et al., 2014).

En este punto, tras la introducción de ABA en la célula comienza una cascada de señalización como la descrita anteriormente en el caso del estrés biótico: producción de ROS, incremento del Ca^{2+} citosólico, cambio en el potencial de la membrana plasmática y pérdida de turgencia de las células de guarda.

En la Figura 1.3 se describen los puntos comunes de la respuesta defensiva frente a estrés biótico y la elaborada frente a estrés hídrico.

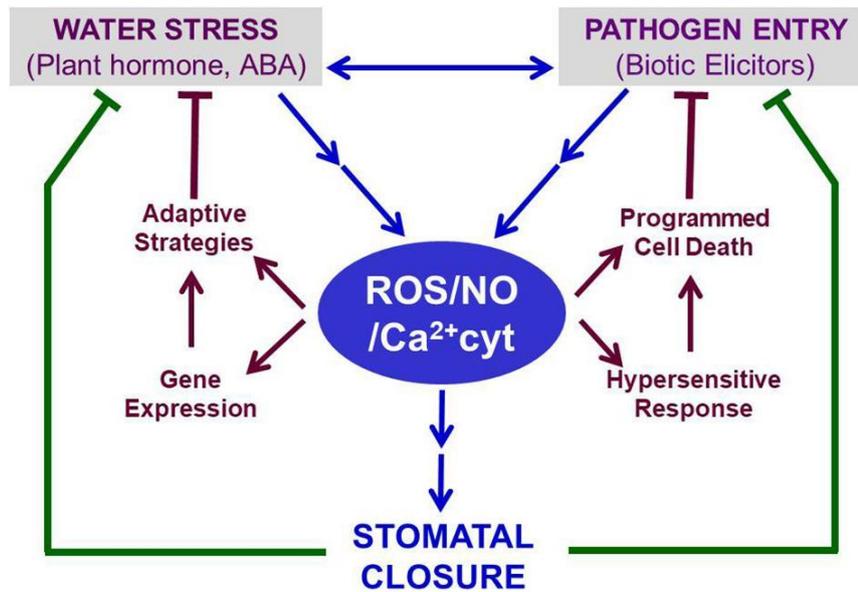


Figura 1. 3. Esquema del cierre estomático inducido bajo condiciones de estrés abiótico o biótico. Las respuestas producidas por un estrés biótico y abiótico poseen muchos mecanismos comunes debido a la acumulación de ABA. ABA eleva los niveles de ROS, NO y Ca^{2+} en la célula. Estos tres mensajeros secundarios inducen el cierre estomático mediante una serie de eventos que conllevan la expulsión iónica y la pérdida de turgencia de las células de guarda. La retención de agua debida al cierre estomático otorga cierta tolerancia a la sequía y, en paralelo, evita la introducción de patógenos. Además, las ROS, el NO y el Ca^{2+} inducen otras respuestas adaptativas como la HR, la muerte celular programada o cambios transcripcionales. Por ello, estos mensajeros secundarios se consideran reguladores vitales y esenciales en la respuesta estomática mediada por ABA (Bharath et al., 2021).

1.4 EL PAPEL DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN EL SISTEMA DEFENSIVO DE LAS PLANTAS

La respuesta defensiva de las plantas está conformada por una gran variedad de mecanismos que confluyen y persiguen la supervivencia de la planta. Entre las respuestas más complejas y relevantes cabe destacar la biosíntesis de metabolitos secundarios de tipo volátil que promueven cambios fisiológicos concretos que ayuden a sortear las dificultades que supone un estrés. Así, las plantas, además de liberar a la atmósfera gases simples como el oxígeno, el dióxido de carbono o el vapor de agua, se sabe que son capaces de emitir una gran cantidad de terpenos, derivados de ácidos grasos, bencenoides, fenilpropanoides y metabolitos derivados de aminoácidos a los que se les denomina *Volatile Organic Compounds* (VOCs) (Holopainen & Gershenzon, 2010). La abundancia de estos compuestos es sorprendente, pues se alcanzan los más de 1700 compuestos identificados en 90 familias de plantas diferentes (Dudareva et al., 2013).

La biosíntesis de los VOCs depende de la disponibilidad de elementos como el carbono, el nitrógeno o el azufre y de la energía proporcionada por el metabolismo primario. De esta manera, el metabolismo de estos compuestos está estrechamente ligado con el metabolismo primario y, de hecho, parte de estructuras moleculares simples también participan del metabolismo más primitivo. De esta manera, es posible distinguir cuatro vías principales de biosíntesis de VOCs, en función del metabolito primario de origen. Así, la vía del shikimato daría como resultado bencenoides y fenilpropanoides; la del metileritritol fosfato (MEP), terpenos y volátiles derivados de los carotenoides; la del ácido mevalónico (MVA), más terpenos, y la de las lipooxigenasas (LOX), metil jasmonato (MJ) y *Green Leaf Volatiles* (GLVs) (Dudareva et al., 2013).

1.4.1 Green Leaf Volatiles (GLVs)

Los GLVs son aldehídos, ésteres y alcoholes de bajo peso molecular (suelen constar de 6 carbonos) derivados de ácidos grasos -como el linoleico o el linolénico- que entran en la vía de las LOX. Se asume que la procedencia de los ácidos grasos a partir de los cuales se generan estos

GLVs es la hidrólisis de membranas. No obstante, poco se sabe acerca de las lipasas que procesarían estos ácidos grasos para su posterior introducción en la ruta de las lipooxigenasas. De hecho, hasta hoy solo se han identificado dos lipasas implicadas en la generación de GLVs: la fosfolipasa Dα4 y la Dα5. Aun así, se sabe que es tras el tratamiento de las lipasas cuando estos ácidos grasos se tornan sustratos accesibles para las enzimas LOX. En este punto, cabe destacar la acción de la LOX-13, una lipooxigenasa que actúa sobre el C13 de la cadena, generando 13-hiperóxidos que podrán ser procesados por una hiperóxido liasa (HPL) que, a su vez, dará lugar a (Z)-3-hexenal. A partir de este aldehído continúa la síntesis de los diferentes GLVs, mediante la acción de enzimas tales como alcohol deshidrogenasas y alcohol aciltransferasas (Ameye et al., 2018; Dudareva et al., 2013).

Estos compuestos son sintetizados en las partes verdes de las plantas y pueden encontrarse de forma constitutiva o en respuesta a estímulos causantes de distintos tipos de estrés, como el ataque de herbívoros, una infección bacteriana o unas condiciones ambientales hostiles. La importancia de los GLVs reside en la variedad de funciones que poseen, pues son liberadas como respuesta genérica a múltiples estreses, lo que implica que este tipo de sustancias podrían estar implicadas en una inmensidad de cambios fisiológicos (Ameye et al., 2018).

En un principio, se pensaba que la liberación de GLVs solo estaba asociada al daño mecánico provocado por pequeños herbívoros. Poco a poco se ha ido observando esta respuesta frente a infección de diversos patógenos y estreses de tipo abiótico. Por ejemplo, se ha visto que las infecciones de tipo fúngico conllevan un incremento de GLVs en la planta, aunque no se conoce exactamente si es un mecanismo de defensa de la planta, una estrategia del patógeno para ser más virulento o, simplemente, una consecuencia del daño oxidativo producido por las toxinas del microorganismo. Estudios recientes sugieren que la mayor producción de GLVs en infecciones fúngicas derivan de las interferencias producidas por el microorganismo en los mecanismos de defensa del huésped, como en la acumulación de callosa en la pared celular. Como consecuencia, se eleva la concentración de ácidos grasos libres, que terminan implicados en la biosíntesis de los GLVs. Por tanto, aunque no se conozcan todos los mecanismos de acción por los cuales se induce la síntesis de otros compuestos, se han considerado respuestas -o consecuencia- de múltiples tipos de estrés, tal y como se muestra en la Figura 1.4. (Ameye et al., 2018; Dudareva et al., 2013).

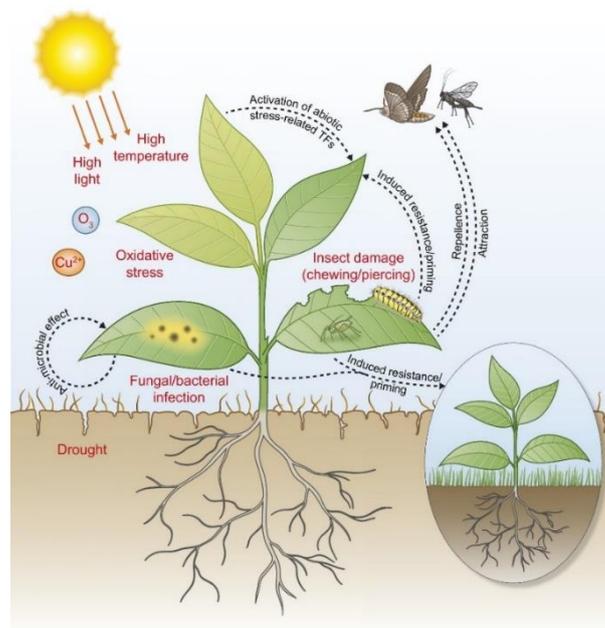


Figura 1. 4. Resumen de las funciones de los GLVs frente a la exposición de diferentes tipos de estrés. Los estímulos inductores de la producción de GLVs se representan en color rojo y las funciones de estos, en negro (Ameye et al., 2018).

1.4.2 Butanoato de Z-3-hexenilo

Previamente, en nuestro laboratorio, se realizaron estudios metabolómicos que tuvieron como objeto encontrar moléculas directamente asociadas a la respuesta defensiva de las plantas frente a la infección de un microorganismo biótrofo. Estos estudios se basaron en la infección de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad Rio Grande Pto con *Pseudomonas syringae*, un microorganismo modelo para el estudio de la interacción planta-patógeno. Tras forzar la infección con dos cepas diferentes de este microorganismo, una virulenta y otra avirulenta, se hizo una recogida de material foliar que se analizó en un sistema de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS). De esta manera, se obtuvieron dos perfiles metabolómicos diferenciales que permitieron asociar la acumulación de ciertas moléculas a la respuesta defensiva del huésped. Entre la gran variedad de compuestos colátiles que se identificaron, cabe destacar los ésteres del (Z)-3-hexenol (acetato de (Z)-3-hexenilo (HA), propanoato de (Z)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (Z)-3-hexenilo (HiB) y butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB)) y algunos monoterpenos hidroxilados, como el α -terpineol, el 4-terpineol y el linalool (López-Gresa et al., 2017).

Al análisis metabolómico le sucedieron otros estudios que cercioraran los resultados obtenidos. Se hizo, entre otros experimentos, una comprobación de expresión génica de genes relacionados con la biosíntesis de los compuestos detectados en el análisis metabolómico. Esto permitió confirmar la relación entre la inducción de genes relacionados con la síntesis de los susodichos VOCs y la acumulación de los mismos (López-Gresa et al., 2018). Además, a partir de estos resultados, se decidió llevar a cabo un análisis sobre las implicaciones que pudiera tener la aplicación exógena de cada uno de estos compuestos en diferentes especies de plantas, analizando del posible efecto de estos compuestos, de manera directa (actividad bactericida), como de manera indirecta. Para evaluar estos aspectos, en estos ensayos, se estudiaron diferentes parámetros relacionados implicados en la respuesta defensiva de la planta: el cierre estomático, la expresión de genes relacionados con la respuesta defensiva, la acumulación de compuestos señaladores... En este análisis destacó uno de los compuestos, que mostró capacidad para inducir el cierre estomático y otorgar resistencia frente a ciertos estreses bióticos, como la infección por *Pseudomonas syringae*. Este compuesto volátil, el butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB), llegó a patentarse por sus propiedades interesantes para la prevención de plagas de tipo bacteriano (Lisón et al., 2017).

Posteriormente, se diseñaron experimentos para profundizar en el mecanismo de acción del HB y estudiar otras posibles aplicaciones de interés agronómico. Por un lado, se intentó observar si la resistencia otorgada frente a patógenos como *Pseudomonas syringae* derivaba del cierre estomático principalmente o estaba asociada a la inducción de genes *PR*. Para ello, se realizaron tratamientos con el compuesto y, después, se hicieron infecciones utilizando distintas técnicas; pues una técnica como la inyección demostraría la relevancia del cierre estomático en la resistencia y la inyección descartaría el factor del cierre estomático, proporcionando información sobre la importancia de los cambios transcripcionales. Además, se consideró la idea de que el HB funcionara de manera dependiente al SA, pues es una molécula esencial en la defensa contra organismos biótrofos y hemibiótrofos y es partícipe de la regulación estomática en la respuesta defensiva (Panchal & Melotto, 2017). Para ello, se hicieron experimentos con plantas *NahG*, mutantes incapaces de acumular SA y se observó que el mecanismo de acción de HB no estaba supeditada a la presencia de ácido salicílico (Brading et al., 2000; Payá, 2019).

Por otro lado, también se llevaron a cabo ensayos de exposición a otros estreses, observando que el HB otorgaba cierta tolerancia a la sequía gracias a su capacidad de inducción del cierre estomático -se promovía la retención de agua-, (Payá, 2019). No obstante, tras estos estudios quedaron incógnitas sobre el modo de acción de esta molécula, pues aún no se conoce la forma en la que se produce el cierre estomático derivado de la presencia de HB.

Por ello, en el presente trabajo se pretende profundizar en el mecanismo de acción de este compuesto, centrándose -sobre todo- en las rutas de señalización defensiva en las que pudiera estar implícito para producir el cierre estomático. Expuestos los antecedentes, conociendo la independencia del funcionamiento de HB con respecto a la ruta de SA y teniendo en cuenta que el cierre estomático es el efecto principal por el cual este compuesto otorga tolerancia a determinados estreses, el diseño experimental propuesto se centra en el análisis de los efectos del tratamiento con HB en mutantes de tomate con menor cantidad de ABA, otra molécula esencial en el cierre estomático y en la respuesta defensiva de la planta.

2 OBJETIVOS

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio permitieron la identificación de diversos GLVs cuya emisión aumentaba en condiciones de estrés biótico (infección por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000). A partir de estos estudios, se comprobó que la aplicación exógena de algunos de estos compuestos a plantas no sometidas a ningún estrés induce ciertos cambios fisiológicos en estas. En dichos experimentos, el compuesto que más destacó por sus efectos fue el butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB), que mostró capacidad para inducir el cierre de estomas y para aumentar los niveles de expresión de genes relacionados con la respuesta defensiva de la planta. De esta manera, tratamientos con HB son capaces de conferir tolerancia a estreses de diferente naturaleza (López-Gresa et al., 2017, 2018).

En esta misma línea, en el presente Trabajo Fin de Grado se pretende elucidar el mecanismo de acción del HB, en cuanto al cierre estomático se refiere. Por esto, a continuación, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- I. Estudio de la implicación del ácido abscísico (ABA) el modo de acción del HB que resulta en el cierre estomático.
- II. Estudio de la implicación del ABA en la inducción mediada por HB de genes relacionados con la respuesta defensiva (*PR1*), el cierre estomático (*SLAC1* y *MYB44*) y la tolerancia a estrés osmótico (*LEA*).
- III. Estudio de la implicación del ABA en la tolerancia a estrés hídrico y resistencia a patógeno mediada por HB.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para la realización del proceso experimental desarrollado en el presente trabajo, se requirieron dos genotipos diferentes de tomate (*Solanum Lycopersicum*). Concretamente, se utilizaron el genotipo flacca (*flc*), un mutante con alteraciones en la ruta de biosíntesis del ácido abscísico (Imber & Tal, 1970), y su parental correspondiente, Rheinlands Ruhm (RR). Ambas semillas fueron amablemente cedidas por el Prof. Moshe Sagi (Ben-Gurion University, Israel). Todas estas plantas fueron cultivadas en los invernaderos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP).

3.1.1 Esterilización y germinación de semillas

En primer lugar, con la finalidad de preparar las semillas para una germinación adecuada, las semillas se esterilizaron mediante su inmersión en una solución constituida de agua y lejía -en proporción 1:1- y unas gotas (3-4) del detergente Tween20. Para la inmersión, las semillas fueron enclaustradas en una malla permeable que permitía el flujo libre de la solución. Durante los treinta minutos que duró esta esterilización química se procuró mantener una agitación periódica que asegurara el buen contacto del material vegetal y la disolución. Seguidamente, se hicieron tres lavados con el objetivo de eliminar los restos de lejía y detergente. Esta serie de lavados consistió en la inmersión de la malla en tres recipientes con agua destilada estéril durante 5, 10 y 15 minutos, respectivamente. Finalmente, las semillas se dispusieron en una placa Petri de 14 cm de diámetro, sobre papel de filtro humedecido con 14 mL de agua destilada autoclavada. Estas placas fueron selladas con Parafilm y se dejaron incubar 48 horas en condiciones de oscuridad y otras 48 horas en presencia de luz, a 24°C en todo momento. Esta esterilización se realizó mediante en cámaras de flujo laminar, con el objetivo de asegurar la asepsia del entorno. Tras este tiempo de incubación se comprobó que el estado de germinación de las semillas era óptimo para transferirlas a tierra y se procedió a su cultivo en invernadero.

3.1.2 Condiciones de cultivo

Las semillas germinadas fueron trasladadas al invernadero para su traspaso a maceta. Se tomó una maceta de 12 cm de diámetro por cada semilla y se colmó de sustrato (50% turba y 50% perlita). El sustrato fue humedecido antes de la introducción de la semilla.

En el invernadero, las plantas fueron cultivadas a una temperatura oscilante entre los 18°C y los 25°C, y con una humedad relativa de entre el 50 y el 70%. El fotoperiodo al que se sometieron fue de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) y el riego fue constante hasta el inicio del tratamiento. A aquellas plantas que, como consecuencia del tratamiento propio del diseño experimental tuvieran que ser expuestas a estrés hídrico, se les retiró el riego tras alcanzarse las cuatro semanas de edad.

3.2 TRATAMIENTO CON BUTANOATO DE (Z)-3-HEXENILO

Se llevaron a cabo dos experimentos para estudiar el modo de acción del HB. En el experimento de estrés biótico se cultivaron plantas de los genotipos Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (*flc*) y se trataron con HB (+HB) y con H₂O (-HB) antes de llevar a cabo una infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. En el experimento de estrés abiótico, plantas de los genotipos Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (*flc*) se sometieron a condiciones de riego (control) y sequía (estrés hídrico) a la vez que se le hacían tratamientos de pulverización de HB (+HB) y H₂O (-HB). En la Figura 3.1. se muestra un esquema del diseño experimental.

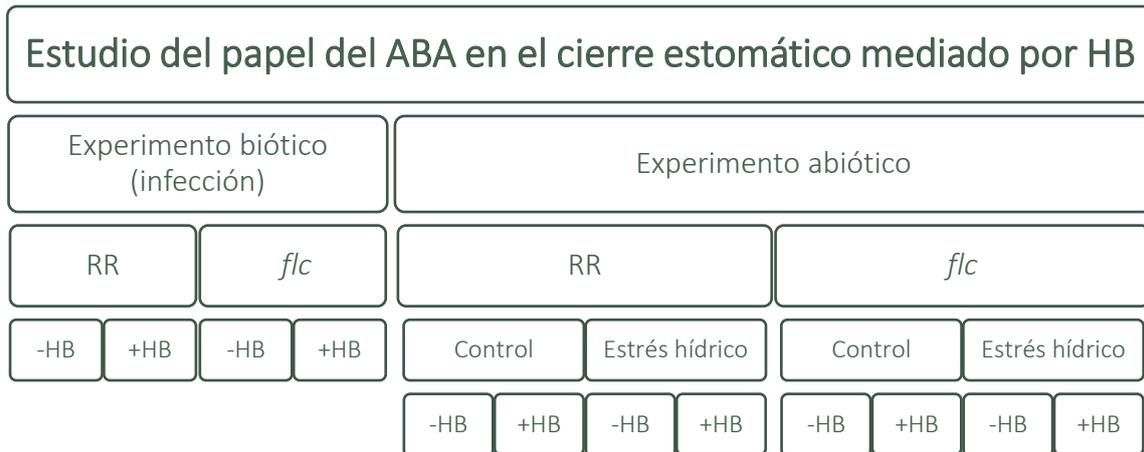


Figura 3. 1. Esquema del diseño experimental expuesto en el presente trabajo.

3.2.1 Tratamiento en cámaras de metacrilato

Para realizar el tratamiento de HB en cámaras de metacrilato se dejaron crecer ocho plantas de tomate de la variedad RR y ocho plantas de la variedad *flc* durante, al menos, 28 días. Cuando estas alcanzaron el tamaño adecuado, fueron repartidas en cuatro cajas de metacrilato de 110 litros de capacidad. De esta manera, en cada caja se aplicó un tratamiento distinto: 4 plantas RR -HB, 4 plantas RR/+HB, 4 plantas *flc*/-HB y 4 plantas *flc*/+HB. Los tratamientos se llevaron a cabo humedeciendo algodoncillos hidrofílicos con el volumen correspondiente a 5 µM de HB (alrededor de 1 ppm). Para las plantas que no debían ser tratadas con HB, se utilizó el mismo volumen de agua destilada, como control.

3.2.2 Tratamiento mediante pulverización en diferentes genotipos de *Solanum Lycopersicum* expuestos a condiciones distintas

En este caso, plantas de tomate de las variedades RR y *flc* se dejaron crecer durante 28 días en las condiciones ya desarrolladas previamente. Una vez alcanzaron el tamaño óptimo (tamaño adecuado de la 3ª y 4ª hoja), 48 plantas de cada genotipo fueron expuestas a cuatro condiciones distintas (doce plantas por cada condición): plantas regadas -HB, plantas regadas +HB, plantas en estrés hídrico -HB y plantas en estrés hídrico +HB.

De este modo, el tratamiento con HB se hizo mediante pulverización del producto a una concentración 2mM. Además, a la solución de HB se adicionó una pequeña proporción tensoactivo Tween20 (0,05%), importante para garantizar la eficacia de los tratamientos ya que este proporciona mejor adhesión del compuesto a la hoja. A las plantas control se las pulverizó con una disolución de agua y Tween20 (también al 0,05%). Para evitar la expansión del compuesto volátil a plantas control, se apartaron las plantas que iban a ser tratadas de las que no, de manera que la pulverización se llevó a cabo fuera de la cabina. Tras aplicar de manera uniforme el compuesto y dejar secar, todas las plantas se introdujeron de nuevo en la misma cabina del invernadero a las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad.

Antes de detener el riego para inducir el estrés hídrico, se hizo pre-tratamiento de pulverización con HB y el control. Después, se mantuvo el tratamiento, aplicándose una vez cada dos días durante un período de 6 días.

3.3 MATERIAL MICROBIOLÓGICO, INFECCIÓN Y CONTEO

La bacteria utilizada para el ensayo de estrés biótico fueron *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, microorganismo modelo para el estudio del desarrollo de una infección (interacción compatible) en *Solanum lycopersicum* (Xin & He, 2013).

3.3.1 Preparación del inóculo bacteriano

La preparación del inóculo bacteriano comenzó con el cultivo de la bacteria en un medio LB agar con rifampicina (10 mg/mL) y kanamicina (0,5 mg/mL) en placas Petri de 90 mm de diámetro, durante 48 horas a 28°C y en oscuridad. De las colonias producidas en esta incubación, se seleccionaron algunas y se recogieron haciendo uso de puntas de pipeta. Se seleccionó una colonia para cada tubo Falcon de 50 mL que contenía 5 mL cada uno de medio de King B líquido suplementado con rifampicina y MgSO₄ 1M. Este pre-cultivo fue incubado durante 24 horas en agitación a 28°C. Transcurrido ese tiempo, se traspasó 1 mL de cada uno de los Falcon a otro tubo de la misma capacidad, que se enrasaría con el mismo medio hasta alcanzar los 15 mL de volumen (con el objetivo de promover el crecimiento bacteriano). De nuevo, los cultivos se incubaron durante 24 horas en las condiciones previamente descritas.

Después de la última incubación, se llevó a cabo una centrifugación de 15 minutos a 4000 rpm para precipitar el microorganismo y, así, eliminar el medio líquido King B. Tras esto, el pellet fue resuspendido en 20 mL de una solución de MgCl₂ a 10mM, previamente autoclavado. En este punto, los cuatro Falcon con la bacteria homogeneizada en 20 mL de cloruro de magnesio fueron mezclados en un vaso de precipitados y se tomó una alícuota de 100 µL para hacer una dilución 1:10 que permitiera medir la densidad óptica del cultivo (D.O.). La D.O. del inóculo se midió mediante espectrofotometría, estableciendo una longitud de onda de 600nm. De esta manera, considerando que la infección debía hacerse con un inóculo cuya densidad óptica fuera de 0,1 (lo cual corresponde con 1×10^7 unidades formadoras de colonia por mililitro), se calculó el volumen de cultivo y de MgCl₂ que debían mezclarse para tener el volumen de inóculo adecuado, a una concentración óptima. Por último, se añadió un 0,05% del tensoactivo Silwet L-77 al inóculo, lo cual permitiría una mejor adhesión del patógeno a la hoja.

3.3.2 Infección bacteriana

La infección bacteriana se hizo por inmersión, de manera que las plantas fueron sumergidas en el inóculo durante 30 segundos, realizando ligeros movimientos ascendentes y descendentes constantes (con precaución para evitar daño en cualquier tejido vegetal que pudiera sesgar el desarrollo de la infección y/o la respuesta defensiva de la planta). La infección se llevó a cabo en plantas de 25 a 30 días de edad (tras el traspaso a maceta) que habían sido expuestas al tratamiento en las cámaras de metacrilato.

Este proceso se llevó a cabo con cuatro plantas por cada condición (4 réplicas biológicas).

3.3.3 Conteo bacteriano

El conteo bacteriano se realizó 24 horas después del proceso de inoculación. Para ello, se tomó material vegetal infectado mediante un sacabocados de 0,95 cm² de diámetro. Concretamente, de cada individuo, se obtuvieron tres discos de folíolos comprendidos en la tercera y cuarta hoja. El material vegetal obtenido en este proceso fue inmediatamente sumergido en MgCl₂ 10 mM en viales eppendorf de 2 mL. Los discos de hoja fueron triturados en la solución de MgCl₂ haciendo uso del homogeneizador *TissueLyser II* (Qiagen). A partir de este homogeneizado se hicieron diluciones seriadas 1:10 que, posteriormente, serían sembradas en placas Petri con King B agar suplementado con rifampicina. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28°C, esperando un crecimiento óptimo de *Pst*. Finalmente, se llevó a cabo un recuento de las unidades formadoras de colonias (CFU) con la ayuda de un contador de colonias (Selecta; Vidrafoc).

3.4 ANÁLISIS FENOTÍPICO: ALTURA Y PESO

Tanto la medida del tamaño como del peso se llevó a cabo en plantas con una edad de 28 días (considerando el día del traspaso a maceta como el inicio).

El tamaño de las plantas se midió con una regla, considerando la distancia entre los cotiledones y la hoja más joven.

Por otro lado, para la medida del peso, las plantas fueron seccionadas por encima de los cotiledones con unas tijeras. De esta manera, solo se midió la parte aérea de la planta, descartando la variación del peso que producirían la maceta y el sustrato. Se utilizó una báscula electrónica y un matraz que permitiera la colocación de la planta en vertical, con el objetivo minimizar el contacto de esta con cualquier elemento del entorno que pudiera sesgar la medida.

Este proceso se llevó a cabo con ocho plantas por cada condición (8 réplicas biológicas).

3.5 MEDIDAS DE APERTURA ESTOMÁTICA

Para el estudio de la apertura estomática se tomaron moldes del envés de varios folíolos por planta, haciendo uso de laca de uñas transparente y cinta adhesiva. En este proceso se seleccionaron 4 folíolos de cada planta de manera aleatoria y uniforme, cubriendo su envés con la laca de uñas. Tras la aplicación del esmalte -y tras dejar secar unos segundos-, se colocó cinta adhesiva translúcida sobre el folíolo y se despegó con esmero, arrastrando la capa de pintauñas transparente que había adquirido las formas del tejido. Finalmente, la cinta adhesiva se pegó a un cubreobjetos correctamente etiquetado.

Para la visualización de la muestra, los cubreobjetos fueron colocados sobre portaobjetos, dejando la cinta adhesiva en contacto con la superficie del portaobjetos. Así, mediante un microscopio Leica DC5000 (Leica Microsystems S.L.U.) se observó el tejido vegetal, encuadrando el campo de visión en aquellas zonas donde se detectara presencia de estomas. Se tomaron más de doscientas fotografías por condición para, posteriormente, hacer un análisis de la apertura estomática. El análisis de las capturas se hizo con el programa *ImageJ*, con el cual se pudieron hacer mediciones los ejes mayor y menor de la elipse que supone la apertura del estoma. Esto se hizo con un mínimo de 50 estomas por condición, tanto en el experimento de tipo biótico como en el abiótico. Finalmente, se obtuvo el promedio del ratio de apertura estomática (eje menor entre el eje mayor), de manera que cuanto más cercano a 1 fuera este resultado, más abierto se encontraría el estoma y, cuanto más cercano a 0, más cerrado.

Este proceso se llevó a cabo con cuatro plantas por cada condición (4 réplicas biológicas), de las cuales se sacaron 4 moldes (4 folíolos por planta).

3.6 TOMA DE MUESTRA

Para el estudio de la expresión génica, se recogieron los cinco folíolos de la 3ª y 4ª hoja de cada planta y se sumergieron -inmediatamente- en nitrógeno líquido con el objetivo de minimizar la variación del estado fisiológico del material. Tras esto, el material se almacenó a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

Este proceso se llevó a cabo con cuatro plantas por cada condición (4 réplicas biológicas).

3.7 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE TRANSCRITOS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)

3.7.1 Extracción del RNA total, precipitación y cuantificación

Se procedió a la pulverización del tejido vegetal congelado y a la extracción del RNA del mismo, que se realizó siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante suministrador de EXTRAzol blirt® (Labclinics S.A., Barcelona, España). Así, el material vegetal se mantuvo en frío con nitrógeno líquido hasta que se le hubiera añadido el EXTRAzol; a partir de entonces, se intentó evitar la subida de temperatura de las muestras más allá de los 4°C.

Tras esto, para precipitar el RNA se aplicó el volumen correspondiente de cloruro de litio 6M y se dejó reposar durante un período de 2 horas a una temperatura máxima de 4 °C. Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación que permitiría eliminar el sobrenadante y hacer un lavado con LiCl a menor concentración (3M). De nuevo, se descartó el sobrenadante y se conservó el precipitado (material genético), que se resuspendería en 44 µL de agua DEPC (Dietilpirocarbonato). A esto le prosiguió el tratamiento con DNasa, que eliminaría e DNA genómico que pudiera suponer un interferente en la posterior medida de la expresión génica. Para este tratamiento también se siguió el protocolo proporcionado por Ambion Austin (TX, United States), el fabricante del kit “TURBO DNase”.

3.7.2 Retrotranscripción

Con el objetivo de poder realizar un análisis de la expresión mediante PCR cuantitativa, se llevó a cabo una retrotranscripción del RNA mediante un kit comercial suministrado por Takara Bio Inc (Otsu, Shiga, Japan): *PrimeScript™* RT Reagent Kit. Para que el desempeño de la reacción fuera correcto se debía tomar 1 ng de RNA, por lo que fue necesario cuantificar la concentración de RNA en cada muestra mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, United States). Para la calibración del espectrofotómetro, se utilizó agua DEPC (blanco), estando establecida una longitud de onda de 260 nm. La calidad del material genético también fue comprobada, considerando como aceptables aquellas muestras que presentaban un valor de los ratios $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ comprendido entre 1.8 y 2.1.

Una vez se obtuvo el DNA complementario, se volvió a hacer uso del NanoDrop® ND-1000 para comprobar la concentración y calidad del producto.

3.7.3 Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)

La amplificación del cDNA se llevó a cabo con el reactivo SYBR® Green OCR Master Mix (Applied Biosystems). Los cebadores seleccionados para la amplificación fueron los correspondientes a genes relacionados con la respuesta defensiva frente a estrés biótico y abiótico: *PR1* (Bektas & Eulgem, 2015), para el ensayo biótico y *LEA* (Dure et al., 1989), *SLAC1* (Zhang et al., 2016b) y *MYB44* (Sung Shim & Do Choi, 2013), para el abiótico. Además, como control endógeno se utilizó la actina, por lo que en cada reacción realizada se puso ese gen como control positivo. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados como cebadores en la PCR cuantitativa están representadas en la Tabla 3.1.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate (Applied Biosystems), introduciendo en cada pocillo 10 µL de la solución con los componentes necesarios para la reacción (H₂O milli-Q, cDNA, SYBR® Green Master Mix y primers). Cada muestra acaparó 3 pocillos, es decir, se hicieron 3 réplicas técnicas por réplica biológica. La reacción se llevó a cabo en un equipo que permitió monitorizarla a tiempo real: QuantStudio™ 3 - 96-Well 0.1 mL Block (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, United States).

Tabla 3. 1. Oligonucleótidos seleccionados como cebadores para la amplificación (RT-qPCRs).

GEN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR REVERSO
<i>PR1</i>	5' ACTCAAGTAGTCTGGCGCAACTCA 3'	5' AGTAAGGACGTTGTCCGATCGAGT 3'
<i>SLAC1</i>	5' TTCAGTTGCATGGTGGTCAT 3'	5' GCCAAAGCCTTGTAATGAA 3'
<i>MYB44</i>	5' GGGAGTCGAACAAAAGCAAC 3'	5' TCCAAGCCCTAAACCACTTG 3'
<i>LEA</i>	5' AGCAGATGTTGGAAAAGGAGC 3'	5' ATGCCTATGGTGGGGTATGTG 3'
<i>ACTINA</i>	5' CTAGGCTGGGTTTCGCAGGAGATGATGC 3'	5' GTCTTTTGGACCCATACCCACCATCACAC 3'

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El procesamiento estadístico de los resultados se llevó a cabo con el software Graphpad prism 8 (GraphPad Software Inc, California United States). Así, para los resultados de RT-qPCR del ensayo de estrés biótico se llevó a cabo un ANOVA bidireccional que permitiera detectar las diferencias significativas en cuanto al tratamiento y al genotipo. Por otro lado, en el caso de los resultados de RT-qPCR del ensayo de estrés hídrico se realizó un ANOVA multivariante que permitiera detectar diferencias significativas de expresión entre tratamiento, condición de riego/sequía y genotipo. En ambos casos, el *p* valor fue fijado en 0,05, considerando significativos los que presentaran un valor *p* menor a este. El mismo análisis estadístico se llevó a cabo con las medidas de ratio de cierre estomático.

Por último, para analizar los resultados del conteo bacteriano, se hizo el test *t*-student para cada uno de los genotipos.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL BUTANOATO DE (Z)-3-HEXENILO (HB)

4.1.1 Modo de acción del HB en la inducción de resistencia frente a *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000*

En estudios anteriores se observó que el HB confiere resistencia a infecciones por *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000*. Además, se observó que esta resistencia venía dada, principalmente, por la capacidad de inducción de cierre estomático, lo cual limita la entrada del patógeno (López-Gresa et al., 2018). Asimismo, se comprobó que el mecanismo de acción de HB en cuanto al cierre estomático se refiriera independiente a la ruta de ácido salicílico (Payá, 2019). Sentados estos precedentes, en el presente trabajo se decidió abordar un estudio para comprobar la dependencia de HB con respecto a la presencia de otras moléculas implicadas en el cierre estomático, como el ABA.

En primera instancia, se hizo una revisión bibliográfica de plantas mutantes de tomate que fueran incapaces de sintetizar ABA, al menos, en cantidades habituales. En esta búsqueda de información, se encontró la variedad *flacca* (*flc*), una planta mutante de biosíntesis de ABA, proveniente del parental Rheinlands Ruhm (RR) (Imber & Tal, 1970).

Las plantas *flc* se caracterizan por no ser capaces de producir altas concentraciones de ABA, pues poseen alrededor de un 20-30% menos de ABA en las hojas con respecto a su parental. Además, se ha observado que no es capaz de sintetizar cantidades habituales de ABA como respuesta a estímulos causantes de estrés, como la sequía. Como consecuencia de la carencia de esta hormona, *flc* muestra una menor respuesta estomática que su parental, lo que promueve una mayor conductancia y tasa de transpiración. No obstante, este mutante presenta un potencial hídrico relativo similar al genotipo silvestre, lo cual lleva a pensar que este genotipo sigue estrategias diferentes para evitar la pérdida de agua y compensar la falta de ABA. De hecho, se ha observado que el genotipo mutante contiene en sus células una concentración de osmoprotectores de 2 a 4 veces mayor que su parental, lo cual evita la pérdida de agua excesiva (Živanović et al., 2020).

En cuanto al crecimiento vegetativo, es destacable apuntar que, lejos de lo esperado, *flc* es una planta que tiende a poseer una menor biomasa que su parental pues, pese a presentar bajas concentraciones de un inhibidor del crecimiento como es ABA, presenta altas concentraciones de etileno, que es otra hormona con efecto inhibidor de crecimiento (Nitsch et al., 2012; Živanović et al., 2020). En esta misma línea, se ha observado que las *flc* constan de raíces más cortas que su parental y superficie de hoja menor y se ha constatado que estos caracteres fenotípicos propios de *flc* son reversibles si se aplica ABA de manera exógena -lo cual no sucede con la tasa de transpiración, que no se normaliza- (Dodd et al., 2009).

Por otro lado, los estudios realizados acerca de la respuesta de este genotipo en estrés hídrico han sugerido que estas plantas constan de otros mecanismos de cierre estomático independientes de la ruta de ABA y dependientes del pH, siendo capaces de evitar una pérdida excesiva de agua en condiciones hostiles, aun con un importante descenso del potencial hídrico. De esta manera, se ha visto que, dentro de los mutantes existentes deficientes en ABA, las plantas *flc* tienen un fenotipo vigoroso que se aleja de la marchitez característica de otros mutantes similares, tal y como se aprecia en la Figura 4.1. (Živanović et al., 2020).



Figura 4. 1. Foto de plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (A) y flacca (B) de 4 semanas de edad cultivadas en las mismas condiciones.

Una vez se conoció bien el comportamiento de este mutante y su parental, se pudo proceder al estudio de su respuesta frente a los tratamientos propuestos en el presente trabajo. Así, el primer paso fue el análisis del comportamiento estomático de ambas variedades tras los tratamientos con HB (Figura 4.2.).

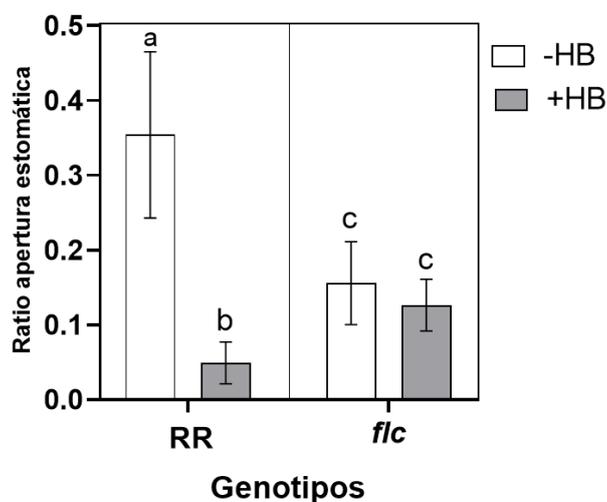


Figura 4. 2. Efecto del butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) en el ratio de apertura estomática en plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (*flc*). Medida de la apertura estomática de plantas tratadas con HB (+HB) o con H₂O (-HB). Se llevó a cabo un experimento independiente con 4 réplicas biológicas y los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de las mismas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA bidireccional, que proporcionó información sobre las diferencias significativas de cada uno de los grupos analizados, considerando un *p-value* < 0.05. Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro.

El estudio estadístico reveló que la variedad RR disminuía su ratio de apertura estomática cuando se exponía a un tratamiento exógeno de HB en cajas de metacrilato, lo cual concordaba con los resultados obtenidos en otros estudios con otras variedades de tomate (López-Gresa et al., 2018). Por otro lado, la variedad *flc* no mostró cierre estomático ante la presencia de HB. Además, en este caso, las plantas *flc* control presentaron -de base- un ratio de apertura estomática menor que su parental en las mismas condiciones. Estos resultados sugieren que las

plantas *flc*, pese a tener una tasa de transpiración mayor, presentan un ratio estomático menor de manera habitual derivado de mecanismos de compensación de la propia planta (Živanović et al., 2020). Dada la pequeña diferencia en el ratio de apertura estomática entre las plantas *flc*/-HB y las *flc*/+HB, el modo de acción HB pareció ser dependiente de ABA.

Con el fin de profundizar en los resultados observados, se decidió realizar una infección con *Pst*, con el objetivo de estudiar las diferencias de la propagación de la infección para cada genotipo y tratamiento. Así, tras los tratamientos con HB en cajas de metacrilato y la toma de los moldes de las hojas que nos permitirían medir el ratio de apertura estomática, se hizo un ensayo de infección bacteriana con *Pst* mediante inmersión. De esta manera, sabiendo que el cierre estomático es la principal razón por la que HB confiere resistencia a estrés biótico, estos resultados podrían complementar los de apertura estomática y acercarnos a conclusiones más certeras sobre el modo de acción del HB.

De esta manera, tal y como se observa en la Figura 4.3., el conteo reveló que los niveles de crecimiento bacteriano habían sido menores en las plantas RR/+HB con respecto a RR-HB, tal y como se esperaba. Sin embargo, entre las plantas mutantes tratadas y no tratadas no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la proliferación bacteriana. A su vez, el recuento de colonias en las plantas *flc* -HB y +HB fue similar al obtenido de las plantas RR/+HB, lo que sugirió que el HB no había otorgado resistencia a patógeno a las plantas mutantes.

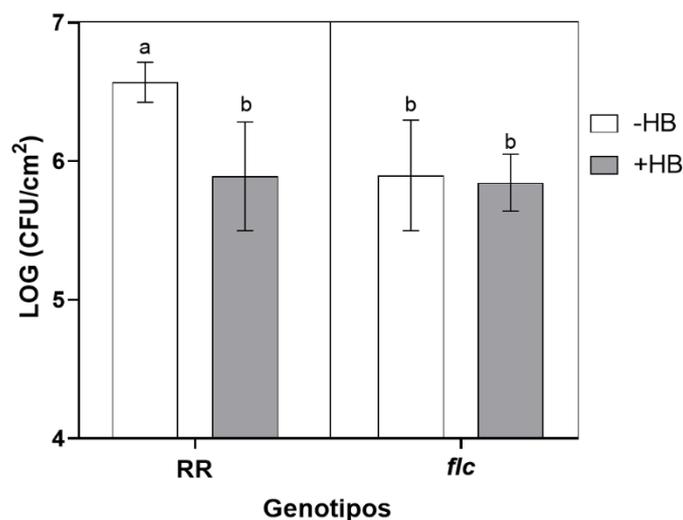


Figura 4. 3. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* en hojas de plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (*flc*) tras un tratamiento con HB (+HB) o H₂O (-HB). La recogida y procesamiento de las muestras foliares se llevó a cabo 24 horas después de la infección. Se llevó a cabo un experimento independiente con 4 réplicas biológicas y los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de las mismas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA bidireccional, que proporcionó información sobre las diferencias significativas de cada uno de los grupos analizados, considerando un *p-value* < 0.05. Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro.

De nuevo, en estos resultados se pudo apreciar el comportamiento estomático anormal de las plantas mutantes, las cuales, en un intento de mantener el equilibrio osmótico celular, parecieron mantener sus estomas lo suficientemente cerrados como para evitar la entrada del patógeno en todo momento (tanto *flc*/+HB como *flc*/-HB). Relacionando estos resultados con los de cierre estomático es posible apuntar que aquellas plantas con concentraciones habituales de ABA (RR) mostraron un comportamiento estomático normal y coincidieron con lo descrito

anteriormente, pues cerraron sus estomas con la aplicación de HB e impidieron la entrada del patógeno a través de estas aperturas naturales. Sin embargo, las plantas con bajas concentraciones de ABA no mostraron respuesta alguna con la aplicación de HB y, además, presentaron un ratio de apertura estomática mucho menor independientemente del tratamiento. Este menor ratio de apertura estomática también pareció otorgar cierta resistencia a la infección del patógeno pues de la misma manera que en las plantas RR/+HB, se impidió la entrada del patógeno y, con ello, se disminuyó el nivel de crecimiento bacteriano.

La lectura que podría hacerse de estos resultados es que el HB tiene un mecanismo de acción dependiente de ABA. Con el fin de profundizar en los resultados observados, se realizó un estudio de la respuesta de estas dos variedades ante la aplicación de HB mediante el análisis de expresión de ciertos genes asociados con la resistencia a estrés biótico y con el comportamiento estomático.

En primer lugar, se llevó a cabo una RT-qPCR para analizar la expresión de *PR1*, uno de los genes más usados como marcador molecular de la respuesta defensiva de las plantas ante un estrés biótico (Bektas & Eulgem, 2015). Asimismo, se estudió la expresión de *MYB44*, que codifica un factor de transcripción inducido en presencia de ABA y de la cepa virulenta de *Pseudomonas syringae* y que confiere cierta resistencia a la infección de esta, pues promueve la resistencia mediada por SA (Sung Shim & Do Choi, 2013). Por otro lado, para comprender mejor el comportamiento de los estomas se estudió la expresión de *SLAC1*, un gen que codifica para una proteína canal encargada de la expulsión de aniones de las células guarda y cuya expresión se induce con estrés hídrico (Zhang et al., 2016a).

Tal y como se muestra en la figura 4.4., con el estudio de expresión de los genes se observó que *PR1* (A) estaba inducido en el caso de las plantas RR/+HB -con respecto a las RR/-HB-. No obstante, lo más relevante de la expresión de este gen fue la respuesta de la variedad *flc*, que lejos de mostrar una inducción de *PR1* derivada de la exposición a HB, mantuvo sus niveles de expresión invariables, volviendo a confluir con los resultados de apertura estomática e infección bacteriana.

De esta manera, pese a que en estudios anteriores se hubiera demostrado que el mecanismo de acción principal por el cual HB otorga resistencia a la infección por *Pseudomonas syringae* es el cierre estomático (López-Gresa et al., 2018; Payá, 2019), estos resultados sugieren que la inducción de *PR1* podría también ser esencial en la tolerancia al estrés biótico. De hecho, la *no-inducción* de *PR1* en el caso de las plantas *flc* tratadas con HB podría ser una de las pistas definitivas en cuanto a la relación que presenta el HB con ABA. En contraste, los genes *SLAC1* y *MYB44* no mostraron diferencias significativas entre condiciones ni entre genotipos, por lo que se podría deducir que el HB no induce su expresión, al menos, en las condiciones establecidas.

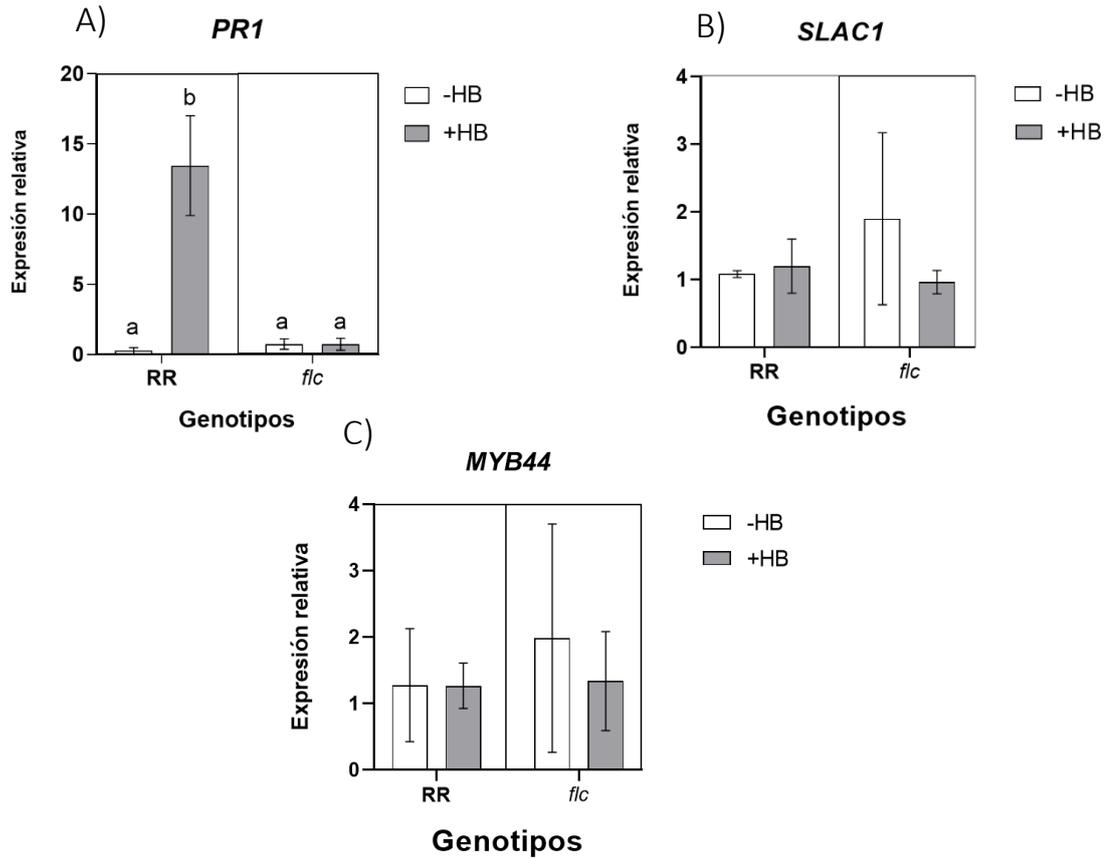


Figura 4. 4. Expresión de los genes *PR1* (A), *SLAC1* (B) y *MYB44* (C) en plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y *flacca* (*flc*) tratadas (+HB) o no tratadas (-HB) con butanoato de (Z)-3-hexenilo. Estos niveles de expresión se midieron en hojas de plantas de tomate expuestas a tratamiento o no de HB durante 24 horas en cajas de metacrilato. De este ensayo se hizo un experimento independiente con 4 réplicas biológicas. Los valores representados corresponden al promedio de la expresión relativa (con respecto al gen endógeno *actina*) \pm el error estándar de las réplicas biológicas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA bidireccional, considerando un *p-value* < 0.05. Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro. La ausencia de letras en las representaciones indica que no existen diferencias significativas.

De esta manera, nuestros resultados parecen sugerir que el mecanismo de acción del HB es dependiente del ABA en cuanto a cierre estomático, ya que se muestran diferencias significativas en el ratio de apertura estomática en la variedad RR, pero no en el genotipo mutante. Estos datos podrían ser correlacionados con los resultados del conteo bacteriano, donde se ve un claro descenso en el número de CFU en las plantas RR tratadas con HB con respecto a las no tratadas, pero no se aprecia esa variación en las del genotipo *flc*. Esto sucedería porque los estomas de las plantas *flc* permanecerían siempre ligeramente cerrados, lo cual otorgaría una ligera tolerancia a la infección bacteriana. Asimismo, en el estudio de expresión génica, se observa una inducción clara de *PR1* en plantas RR tratadas con HB que no es posible apreciar en el genotipo mutante. Esto sugiere que parte de la resistencia de las RR tratadas con HB frente a la infección bacteriana podría estar relacionada con la presencia de más transcritos de *PR1*, aunque esta no fuera la causa directa de la mejor tolerancia al estrés biótico. Por ello, el butanoato de (Z)-3-hexenilo se consideraría también dependiente de ABA para la inducción de *PR1*.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el ABA está implicado en la resistencia a estrés biótico mediada por el compuesto HB.

4.1.2 Modo de acción del HB en la inducción de tolerancia al estrés hídrico

En estudios previos se descubrió que, además de proporcionar resistencia a la infección bacteriana, HB confiere cierta tolerancia al estrés hídrico. Esto se evaluó estudiando la pérdida de peso, la apertura estomática, la fuga de electrolitos y la expresión relativa de algunos genes asociados con la tolerancia a la sequía. En estos estudios se vio que el potencial de cierre estomático del HB se incrementa en condiciones de sequía y que, en consecuencia, la aplicación de este compuesto promueve la retención de agua en la planta. Además, se observó que el aumento de resistencia frente a sequía en plantas tratadas con HB se debe principalmente a la inducción de genes de síntesis de proteínas LEA (Payá, 2019).

Con estos antecedentes, en el presente trabajo se plantea un ensayo que, de manera complementaria a los anteriores, permita hacer deducciones sobre el modo de acción del HB en su papel de promover la tolerancia al estrés hídrico. Para ello, se expusieron plantas de las variedades RR y *flc* a diferentes condiciones de riego (riego y sequía) y tratamiento (HB+ y HB-) con el objetivo de estudiar su respuesta fisiológica.

4.1.2.1 Evaluación fenotípica

En primer lugar, se hicieron evaluaciones fenotípicas. Para ello, tras seis días en las condiciones correspondientes, se tomaron 8 plantas de cada grupo y se hicieron mediciones de peso y altura (Figura 4.5.).

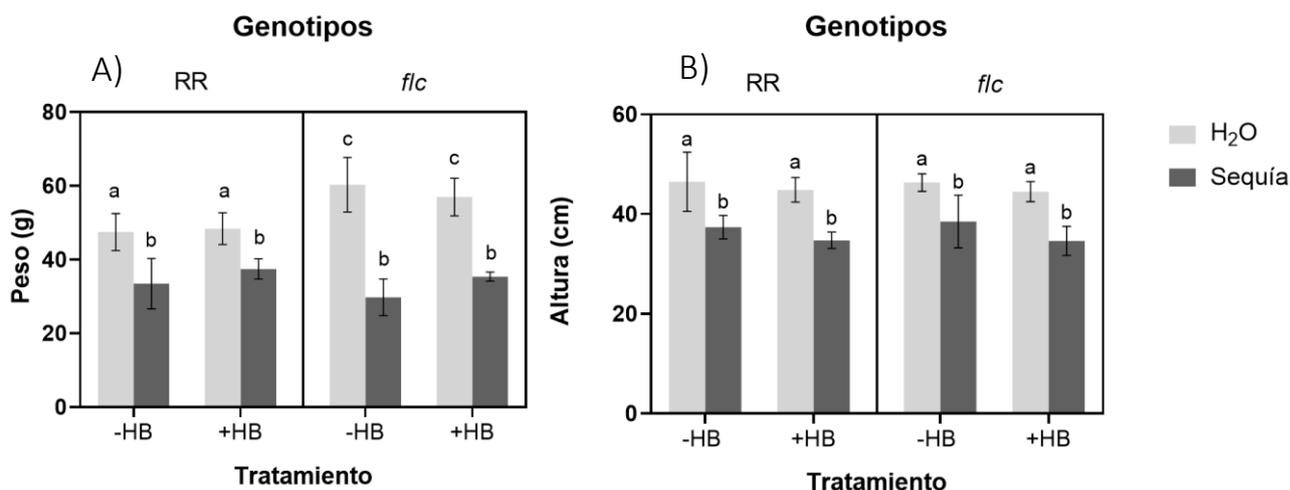


Figura 4. 5. Peso (A) y altura (B) en plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y *flacca* (*flc*) en condiciones de riego (H₂O) o sequía (Sequía) tratadas (+HB) o no tratadas (-HB) con butanoato de (Z)-3-hexenilo. Tanto la altura como el peso se midieron descartando la parte radicular de la planta. De este ensayo se hicieron cuatro experimentos independiente con 8 réplicas biológicas. Los resultados mostrados en los gráficos pertenecen a uno de los experimentos, siendo sus valores representativos de los demás. Los valores representados corresponden al promedio del peso y de la altura \pm el error estándar de las réplicas biológicas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA de tres factores, considerando un *p-value* < 0.05. Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro.

Tal y como se observa en la Figura 4.5 A, el genotipo *flc* presentó un peso mayor que su parental en condiciones de riego habituales, tanto las tratadas como las no tratadas con HB. Esto contrasta con lo expuesto en la bibliografía, pues estas plantas mutantes destacan por tener ritmo

de crecimiento y un peso menores debido a las altas concentraciones de etileno que son capaces de producir (Živanović et al., 2020). Es posible explicar este mayor peso atendiendo a la Figura 4.1., donde se observa que las plantas *flc* cultivadas para este experimento presentaron una mayor densidad de hojas que su parental y, si bien es cierto que sus folíolos eran de menor tamaño, esto podría haber supuesto un incremento en la masa. Además, es importante anotar que en estas mediciones de masa se descartó la parte radicular, lo cual podría ser esencial para apreciar un mayor peso en las plantas RR (el genotipo RR suele tener un sistema radicular más complejo y grande que *flc*) (Imber & Tal, 1970).

Por otro lado, en esta misma figura se puede observar que la pérdida de agua en las plantas *flc* expuestas a sequía fue mayor que la que se vio en el genotipo RR, tanto en el caso de las plantas tratadas con HB como las no tratadas, siendo esta pérdida un poco menor en las planta *flc* tratadas con HB con respecto a las *flc* no tratadas.

Atendiendo al tamaño de las plantas (Figura 4.5. B), es posible afirmar que todas presentaron valores similares: los dos genotipos presentaron una altura similar en las mismas condiciones de tratamiento y riego. De hecho, solo se observaron diferencias significativas entre plantas regadas y plantas en sequía, lo cual habría sido consecuencia de la propia carencia de agua.

Para comprender mejor estos resultados, se calcularon ratios de retención de agua (peso estrés hídrico/peso en riego) que permitirían apreciar las diferencias entre plantas tratadas y no tratadas (Tabla 4.1. y Figura 4.6.).

Tabla 4. 1. Cálculo del ratio de la retención de agua (en gramos) en plantas de cada genotipo y tratamiento. El cálculo se llevó a cabo dividiendo el peso promedio de las plantas en sequía entre el peso promedio de las plantas en riego, para cada uno de los genotipos y tratamientos.

Condición	Ratio (peso en estrés hídrico/peso en riego)
RR Control	0,7048632
RR HB	0,7738187
<i>flc</i> Control	0,4939176
<i>flc</i> HB	0,6204476

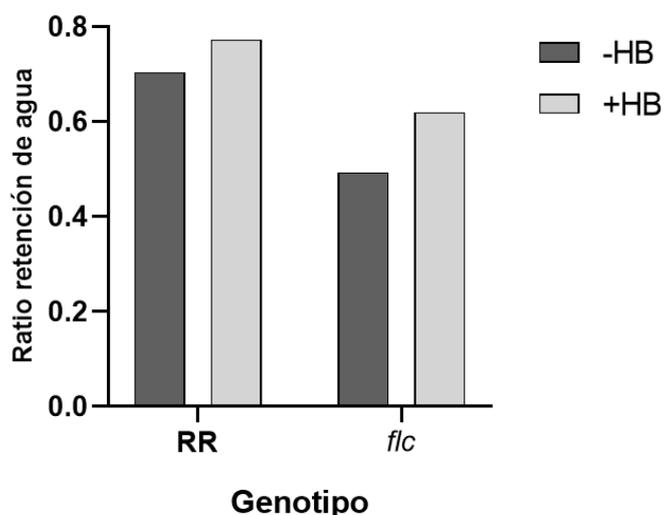


Figura 4. 6 Ratios de retención de agua en plantas de cada genotipo (RR y *flc*) y tratamiento (-HB y +HB).

De esta manera se observó una mayor retención de agua tanto en RR como en *flc* con la aplicación de HB mediante pulverización, confirmando su capacidad de inducir la tolerancia al estrés hídrico previamente descrita. Estos resultados podrían indicar que el efecto del HB en la tolerancia a sequía podría ser independiente de ABA.

La mayor pérdida de agua en el genotipo *flc* -independientemente del tratamiento- se pudo deber a su mayor tasa de transpiración y, pese a los mecanismos de compensación, pareció ser más susceptible a la sequía. Esto coincide con lo descrito en la bibliografía, donde ya se había confirmado que las *flc*, en un período de 6 días de exposición a estrés hídrico, ralentizan el crecimiento de sus hojas y, por ende, disminuyen el peso fresco global (Živanović et al., 2020).

No obstante, quedaron sin resolver incógnitas relacionadas con el fenotipo de las plantas mutantes, pues no se consiguió descubrir la razón objetiva por la cual las *flc* en riego pesaron más que las parentales. Estas pequeñas ambigüedades en el fenotipo de las plantas flacca sugieren la conveniencia de repetir este proceso experimental con otros mutantes deficientes en ABA, pues podrían complementar la información proporcionada por este trabajo.

4.1.2.2 Estudio del comportamiento estomático y la inducción de genes implicados en la respuesta frente a estrés hídrico

Con el objetivo de relacionar estos resultados de peso con los de la apertura estomática, se tomaron moldes del envés de las hojas pertenecientes a plantas de cada condición con el fin de determinar el ratio de apertura estomática. Asimismo, se tomó muestra para la evaluación de la expresión génica de caracteres relacionados con la respuesta frente a estrés osmótico (*LEA*) y con la regulación del cierre estomático (*MYB44* y *SLAC1*).

En este caso, la medición de la apertura estomática (Figura 4.7.) confirmó la capacidad del HB para inducir el cierre estomático en RR en condiciones de riego, como se había visto en el experimento anterior. No obstante, en condiciones de sequía no se observó una inducción del cierre estomático por parte del HB, sino que se vio el cierre propio de la exposición de una planta a un estrés hídrico. Además, la apertura estomática de las plantas RR tratadas en riego fue similar a la mostrada por aquellas plantas (tratadas o no) sometidas a sequía. Esto se podría correlacionar con el mayor ratio de retención de agua exhibido por las plantas RR/+HB con respecto a las plantas RR/-HB.

Por otro lado, la variedad *flc* demostró tener un ratio de apertura estomática mucho menor en ausencia de tratamiento y estrés hídrico que las plantas RR y, como consecuencia, no se observaron diferencias en los valores de este factor entre tratamientos ni entre condiciones de riego. Estos resultados indican que el ABA es necesario para el cierre estomático mediado por sequía. Al igual que había pasado en mediciones de apertura estomáticas previas, el HB no pareció mostrar capacidad de cierre estomático para este mutante con baja concentración de ABA, en ningún caso. Sin embargo sí que pareció otorgar cierta tolerancia a la sequía, pues el ratio de retención de agua fue mayor en aquellas plantas tratadas con HB (Figura 4.5.). En este punto, se plantearon varias posibilidades: la ligera retención de agua de las plantas tratadas con HB con respecto a las no tratadas, en el genotipo mutante *flc*, podría no estar relacionada con el cierre estomático, sino con otro tipo de cambios fisiológicos inducidos por este compuesto; o podría darse el caso de que la técnica de medición de la apertura estomática fuera ineficaz para cambios de apertura sutiles.

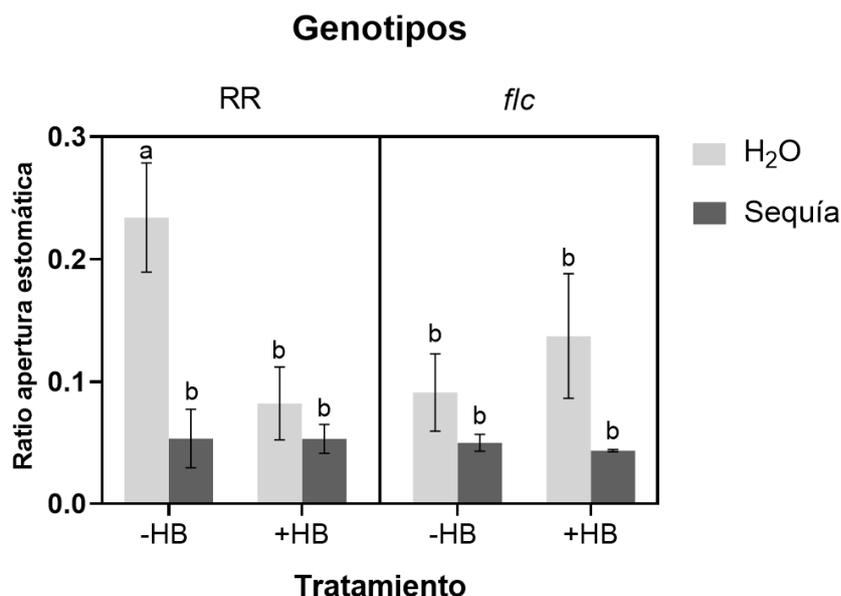


Figura 4. 7. Efecto del butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) en el ratio de apertura estomática en plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (*flc*) en condiciones de riego (H₂O) y estrés hídrico (Sequía). Medida de la apertura estomática de plantas tratadas con HB o con H₂O (control) en riego y sequía. Se llevaron a cabo cuatro experimentos independientes con 4 réplicas biológicas. Los resultados mostrados en los gráficos pertenecen a uno de los experimentos, siendo sus valores representativos de los demás. Se representa la media del ratio de apertura estomática \pm el error estándar de las réplicas biológicas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA de tres factores, que proporcionó información sobre las diferencias significativas de cada uno de los grupos analizados, considerando un *p-value* < 0.05. Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro.

Finalmente, se optó por hacer un estudio de la expresión de ciertos genes que podrían estar implicados en la tolerancia a la sequía y, por ende, podrían ser clave en la respuesta estomática tras la aplicación de HB (Figura 4.8.).

En estudios anteriores, se había visto que HB inducía la expresión de *LEA* en condiciones de estrés hídrico en plantas de tomate MoneyMaker (Payá, 2019). Este ensayo arrojó resultados que concordaron con los observado anteriormente, pues se volvió a observar una inducción de expresión de este gen por parte del HB en condiciones de sequía en plantas no mutantes (RR), tal y como se esperaba (Figura 4.8. A). Las plantas mutantes, en contraste, no indujeron la expresión de este gen como consecuencia del tratamiento de HB, ni en condiciones de riego ni de sequía. De hecho, los niveles de expresión de *LEA* en plantas de la variedad *flc* que habían sido sometidas a estrés hídrico fueron semejantes entre sí independientemente del tratamiento de HB y, además, coincidieron con los niveles de expresión de las plantas RR -HB. Esto, por tanto, sugirió que el modo de acción de HB para la inducción de la expresión de los genes *LEA* sería dependiente de la presencia de ABA.

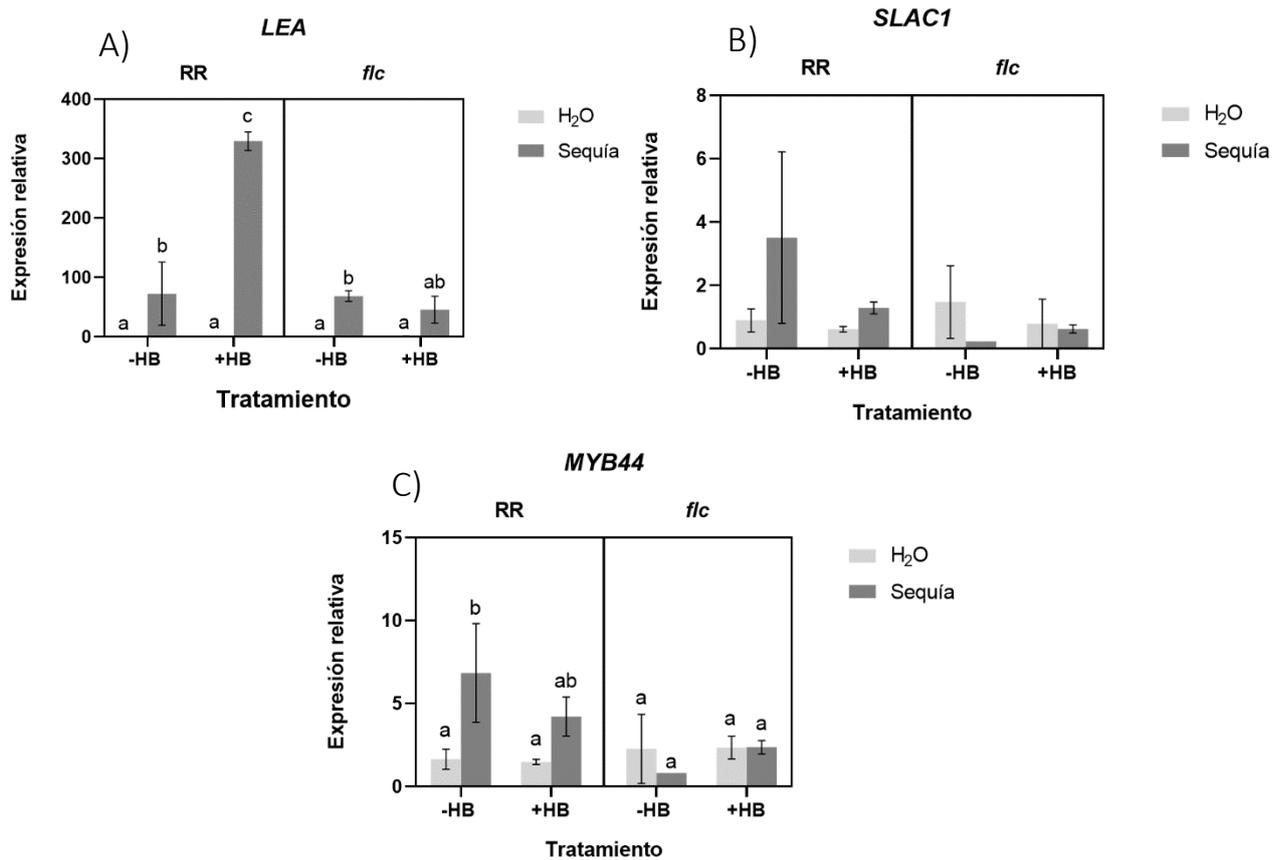


Figura 4. 8. Expresión de los genes *LEA* (A), *SLAC1* (B) y *MYB44* (C) en plantas de tomate de las variedades Rheinlands Ruhm (RR) y flacca (*flc*) tratadas (+HB) o no tratadas (-HB) con butanoato de (Z)-3-hexenilo, en condiciones de riego (H₂O) y estrés hídrico (Sequía). De este ensayo se hicieron 4 experimentos independientes con 4 réplicas biológicas. Los resultados mostrados en los gráficos pertenecen a uno de los experimentos, siendo sus valores representativos de los demás. Los valores representados corresponden al promedio de la expresión relativa (con respecto al gen endógeno *actina*) \pm el error estándar de las réplicas biológicas. El análisis estadístico seleccionado fue un ANOVA de tres factores, considerando un *p-value* < 0.05. Cada letra representa a un grupo de valores que exhibe diferencias significativas con otro. La ausencia de letras en las representaciones indica que no existen diferencias significativas.

Por otro lado, la expresión de *SLAC1* no pareció aportar información relevante (Figura 4.8. B), pues no se observaron diferencias significativas derivadas del genotipo, el tratamiento con HB o las condiciones de riego. Estos resultados concordaron con los obtenidos en el experimento previo, en el que tampoco se observaron cambios en la expresión por el tratamiento de HB, ni en *flc* ni en RR. Esto sugiere que, en el cierre estomático inducido por HB, no estaría relacionado un cambio de expresión de este gen. No obstante, esto no quiere decir que la proteína canal *SLAC1* no intervenga en el proceso de cierre estomático mediado por HB, sino que la aplicación de este compuesto no supondría un cambio transcripcional. No obstante, a pesar de la falta de significación estadística, es posible observar una ligera inducción de *SLAC1* en condiciones de sequía en plantas RR. Estos datos concordarían con lo expuesto en la bibliografía previa, en la que se describe un aumento en el nivel de expresión de este gen con la exposición a sequía en *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al., 2016).

Por su parte, la expresión de *MYB44* aumentó en las plantas RR sometidas a sequía con respecto a las regadas, independientemente del tratamiento de HB (Figura 4.8. C). De hecho, el único efecto derivado del tratamiento de HB fue una ligera represión de la expresión del gen en plantas RR sometidas a sequía. En contraste, las plantas de la variedad flacca mostraron una

expresión de *MYB44* uniforme en todas las circunstancias, no se observó inducción ni en las plantas expuestas a estrés hídrico. Atendiendo a lo previamente descrito y sabiendo que la acumulación de ABA es uno de los principales estímulos que induce la expresión de *MYB44* (Sung Shim & Do Choi, 2013), se podría deducir que la inducción de este gen en plantas RR expuestas a sequía podría derivar de la acumulación de ABA propia de la respuesta al estrés hídrico. De esta manera se podría explicar la falta de inducción en el genotipo *flc* cuando hay escasez de riego.

Por consiguiente, se demostró que el HB tenía capacidad para mediar el cierre estomático en plantas con niveles normales de ABA y que, además, inducía la expresión de un gen de la familia *LEA* con función esencial en la respuesta contra estrés osmótico. Además, se confirmó que el incremento en la expresión de *MYB44* en condiciones de sequía estaba directamente relacionado con la acumulación de ABA, puesto que los mutantes *flc* no manifestaron tal incremento.

Por tanto, estos resultados parecen indicar que el HB es dependiente de ABA en cuanto a cierre estomático y a la inducción por sequía de *LEA* y *MYB44*. Sin embargo, la mayor retención de agua en plantas *flc*/+HB con respecto a las *flc*/-HB parece sugerir que el efecto del HB en la tolerancia a sequía podría ser independiente de ABA.

4.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

En este trabajo de Fin de Grado, además de confirmarse la importancia del HB en la respuesta defensiva de las plantas frente a estreses de diferente naturaleza, se han estudiado los efectos causados por este GLV y se han determinado cuáles de ellos son dependientes de las variaciones de concentración del ABA. De esta manera, se ha observado que esta molécula proporciona un aumento en la resistencia frente al patógeno *Pseudomonas syringae* DC3000 y que esta resistencia deriva, principalmente, del cierre estomático mediado por esta molécula y por la inducción en la expresión de genes relacionados con la respuesta defensiva local (*PR1*). De la misma manera, se ha confirmado que HB mejora los síntomas de estrés hídrico gracias, de nuevo, a su capacidad de cierre estomático y a la inducción de genes esenciales en la respuesta frente a estrés osmótico (gen de la familia *LEA*). De la misma manera, se ha llegado a la conclusión de que el cierre estomático mediado por HB necesita de la presencia de ABA para ejecutarse de una manera eficaz y que la inducción de los genes *PR1* y *LEA* es, también, dependiente a la acumulación de ABA como respuesta al estrés.

Con el fin de profundizar en el hecho de que la tolerancia mediada por HB podría ser independiente de ABA, sería conveniente incluir la evaluación de otros cambios fisiológicos para entender el efecto que provoca HB en las plantas con carencia de ABA. Otro aspecto a tener en cuenta para futuras investigaciones sería la posibilidad de complementar las mediciones de apertura estomática con otro tipo de evaluaciones que permitieran la apreciación de cambios fisiológicos más sutiles que pudieran ser significativos para el estudio del modo de acción del HB. Además, para clarificar qué eventos mediados por el HB son dependientes de ABA y cuáles son independientes, se deberían evaluar más rasgos fenotípicos característicos de tolerancia y susceptibilidad a un estrés. Por último, la obtención de medidas de ABA en ambos genotipos y para todas las condiciones sería de gran interés.

A partir de nuestros resultados, se podría ir perfilando el modo de acción de este compuesto volátil y las relaciones que establece con otras moléculas relevantes en la tolerancia de la planta a ciertos estreses. Así pues, podría evaluarse la importancia de la presencia de otras sustancias como el etileno (ET) o el ácido jasmónico (JA) con plantas mutantes que presenten

concentraciones anómalas de estas, como las mutantes *Never ripe* -insensibles al ET- (Lanahan et al., 1994), las mutantes *Jai* -insensibles al JA- (Li et al., 2004) o, incluso, probar con otro mutante con carencias de ABA, como el mutante *sitiens* (Taylor et al., 1988).

Estos ensayos podrían ayudar a afinar el modo de acción del HB y, por consiguiente, podrían ser clave para perfilar composición de un producto agronómico basado en este compuesto volátil -previamente patentado-. De esta manera, la adición de otras sustancias de origen vegetal podrían potenciar el efecto del HB o extender su efectividad a otros cultivos sin perder el carácter sostenible del producto. Además, para la aplicación directa en la agricultura, se deberían diseñar experimentos que ayudaran a establecer la duración del efecto del producto, la aplicación más adecuada para una mayor efectividad y las dosis mínima y máxima para producir una respuesta favorable en el cultivo. Por otro lado, sería interesante validar el efecto del producto en otras especies vegetales de interés económico -como pudieran ser algunas plantas ornamentales o frutales- y en otros ambientes -fuera del entorno de un invernadero-.

Otro abordaje en el aprovechamiento de las características del HB sería uno basado en la comunicación interplanta, un fenómeno que ha sido observado en numerosas ocasiones como respuesta a diversos estreses bióticos, como el ataque de herbívoros o patógenos (Kost & Heil, 2006; Meents & Mithöfer, 2020). Así, conocer el modo de acción del HB permitiría producir plantas transgénicas que emitieran VOCs de manera constitutiva (*eVOCs*) y produjeran un efecto positivo de tolerancia a diversos estreses en plantas conlindantes (*rVOCs*) (López-Gresa et al., 2018).

Por último, sería interesante dirigir los siguientes estudios hacia la observación de otros posibles efectos del compuesto en diferentes especies vegetales, ante otros patógenos “no modelo” y en diversas partes de la planta (estudio de las raíces, del fruto, de la floración...). De esta manera, además de encontrar más aplicaciones interesantes de este GLV, se contribuiría a la deducción de su modo de acción.

5 CONCLUSIONES

- I. El cierre estomático, la inducción de *PR1* y la resistencia al estrés biótico que están mediados por HB son dependientes de la ruta de ABA.

- II. El cierre estomático provocado por la sequía, así como la inducción por HB de *LEA* y *MYB44* en condiciones de sequía son dependientes de la ruta de ABA.

6 BIBLIOGRAFÍA

- AMEYE, M., ALLMANN, S., VERWAEREN, J., SMAGGHE, G., HAESAERT, G., SCHUURINK, R. C., & AUDENAERT, K. (2018). Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis. In *New Phytologist* (Vol. 220, Issue 3, pp. 666–683). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/nph.14671>
- BARTHAKUR, S., BABU, V., & BANSAL, K. C. (2001). Over-expression of Osmotin Induces Proline Accumulation and Confers Tolerance to Osmotic Stress in Transgenic Tobacco. In *J. Plant Biochemistry & Biotechnol%gyVol* (Vol. 10).
- BEKTAS, Y., & EULGEM, T. (2015). Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in Plant Science*, 5(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00804>
- BHARATH, P., GAHIR, S., & RAGHAVENDRA, A. S. (2021). Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure: An Important Component of Plant Defense Against Abiotic and Biotic Stress. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12, p. 324). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.615114>
- BRADING, P. A., HAMMOND-KOSACK, K. E., PARR, A., & JONES, J. D. G. (2000). Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant Journal*, 23(3), 305–318. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00778.x>
- CIAIS, P., REICHSTEIN, M., VIOVY, N., GRANIER, A., OGÉE, J., ALLARD, V., AUBINET, M., BUCHMANN, N., BERNHOFER, C., CARRARA, A., CHEVALLIER, F., DE NOBLET, N., FRIEND, A. D., FRIEDLINGSTEIN, P., GRÜNWARD, T., HEINESCH, B., KERONEN, P., KNOHL, A., KRINNER, G., ... VALENTINI, R. (2005). Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, 437(7058), 529–533. <https://doi.org/10.1038/nature03972>
- CONRATH, U. (2006). Systemic acquired resistance. *Plant Signaling and Behavior*, 1(4), 179–184. <https://doi.org/10.4161/psb.1.4.3221>
- DODD, I. C., THEOBALD, J. C., RICHER, S. K., & DAVIES, W. J. (2009). Partial phenotypic reversion of ABA-deficient flacca tomato (*Solanum lycopersicum*) scions by a wild-type rootstock: Normalizing shoot ethylene relations promotes leaf area but does not diminish whole plant transpiration rate. *Journal of Experimental Botany*, 60(14), 4029–4039. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp236>
- DUDAREVA, N., KLEMPIEN, A., MUHLEMANN, J. K., & KAPLAN, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. In *New Phytologist* (Vol. 198, Issue 1, pp. 16–32). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/nph.12145>
- DURE, L., CROUCH, M., HARADA, J., HO, T. H. D., MUNDY, J., QUATRANO, R., THOMAS, T., & SUNG, Z. R. (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 12(5), 475–486. <https://doi.org/10.1007/BF00036962>
- GRILLO, S., LEONE, A., XU, Y., TUCCI, M., FRANCIONE, R., HASEGAWA, P. M., MONTI, L., & BRESSAN, R. A. (1995). Control of osmotin gene expression by ABA and osmotic stress in vegetative tissues of wild-type and ABA-deficient mutants of tomato. *Physiologia Plantarum*, 93(3), 498–504. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb06849.x>
- HIRAYAMA, T., & SHINOZAKI, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *Plant Journal*, 61(6), 1041–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04124.x>

- HOLOPAINEN, J. K., & GERSHENZON, J. (2010). multiple stress factors and the emission of plant volcs. In *Trends in Plant Science* (Vol. 15, Issue 3, pp. 176–184). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.006>
- IMBER, D., & TAL, M. (1970). Phenotypic reversion of flacca, a wilted mutant of tomato, by abscisic acid. *Science*, *169*(3945), 592–593. <https://doi.org/10.1126/science.169.3945.592>
- KATAGIRI, F., THILMONEY, R., & HE, S. Y. (2002). The Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas Syringae Interaction. *The Arabidopsis Book*, *1*(1), e0039. <https://doi.org/10.1199/tab.0039>
- KOST, C., & HEIL, M. (2006). Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology*, *94*(3), 619–628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01120.x>
- LANAHAN, M. B., YEN HSIAO CHING, GIOVANNONI, J. J., & KLEE, H. J. (1994). The Never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell*, *6*(4), 521–530. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.4.521>
- LI, L., ZHAO, Y., MCCAIG, B. C., WINGERD, B. A., WANG, J., WHALON, M. E., PICHERSKY, E., & HOWE, G. A. (2004). The Tomato Homolog of Coronatine-Insensitive1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. *Plant Cell*, *16*(1), 126–143. <https://doi.org/10.1105/tpc.017954>
- LISÓN, P., LÓPEZ-GRESA, P., RODRIGO, I., & BELLÉS ALBERT, J.-M. (2017). *Compuesto para la protección de plantas mediante cierre estomático, uso, composición y método relacionados* (Patent No. P201730685). <http://hdl.handle.net/10261/176810>
- LÓPEZ-GRESA, M. P., LISÓN, P., CAMPOS, L., RODRIGO, I., RAMBLA, J. L., GRANELL, A., CONEJERO, V., & BELLÉS, J. M. (2017). A non-targeted metabolomics approach unravels the VOCs associated with the tomato immune response against *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1188. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01188>
- LÓPEZ-GRESA, M. P., PAYÁ, C., OZÁEZ, M., RODRIGO, I., CONEJERO, V., KLEE, H., MARÍA BELLÉS, J., & LISÓN, P. (2018). A New Role For Green Leaf Volatile Esters in Tomato Stomatal Defense Against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1855. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01855>
- MAFFEI, M. E., ARIMURA, G. I., & MITHÖFER, A. (2012). Natural elicitors, effectors and modulators of plant responses. *Natural Product Reports*, *29*(11), 1288–1303. <https://doi.org/10.1039/c2np20053h>
- MAUREL, C., JAVOT, H., LAUVERGEAT, V., GERBEAU, P., TOURNAIRE, C., SANTONI, V., & HEYES, J. (2002). Molecular physiology of aquaporins in plants. *International Review of Cytology*, *215*, 105–148. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)15007-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)15007-8)
- MEENTS, A. K., & MITHÖFER, A. (2020). Plant–Plant Communication: Is There a Role for Volatile Damage-Associated Molecular Patterns? In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11, p. 1538). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.583275>
- NITSCH, L., KOHLEN, W., OPLAAT, C., CHARNIKHOVA, T., CRISTESCU, S., MICHIELI, P., WOLTERS-ARTS, M., BOUWMEESTER, H., MARIANI, C., VRIEZEN, W. H., & RIEU, I. (2012). ABA-deficiency results in reduced plant and fruit size in tomato. *Journal of Plant Physiology*, *169*(9), 878–883. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.02.004>
- OSAKABE, Y., OSAKABE, K., SHINOZAKI, K., & TRAN, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, p. 86). Frontiers Research Foundation.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>

- PANCHAL, S., & MELOTTO, M. (2017). Stomate-based defense and environmental cues. *Plant Signaling & Behavior*, 12(9), e1362517. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1362517>
- PAYÁ, C. (2019). *Butanoato de (Z)-3-hexenilo: eficacia y mecanismo de acción* [Universitat Politècnica de València]. <https://riunet.upv.es/handle/10251/118823>
- SHINOZAKI, K., & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (1997). Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response'. In *Plant Physiol* (Vol. 11).
- SUNG SHIM, J., & DO CHOI, Y. (2013). Direct regulation of WRKY70 by AtMYB44 in plant defense responses. *Plant Signaling & Behavior*, 8(6), e24509. <https://doi.org/10.4161/psb.24509>
- TAYLOR, I. B., LINFORTH, R. S. T., AL-NAIEB, R. J., BOWMAN, W. R., & MARPLES, B. A. (1988). The wilted tomato mutants flacca and sitiens are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant, Cell & Environment*, 11(8), 739–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1988.tb01158.x>
- WU, L., CHEN, H., CURTIS, C., & FU, Z. Q. (2014). Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence*, 5(7), 710–721. <https://doi.org/10.4161/viru.29755>
- 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>
- YU, X., FENG, B., HE, P., & SHAN, L. (2017). From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. In *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 55, pp. 109–137). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035649>
- ZHANG, A., REN, H. M., TAN, Y. Q., QI, G. N., YAO, F. Y., WU, G. L., YANG, L. W., HUSSAIN, J., SUN, S. J., & WANG, Y. F. (2016a). S-type anion channels SLAC1 and SLAH3 function as essential negative regulators of inward K⁺ channels and stomatal opening in arabidopsis. *Plant Cell*, 28(4), 949–965. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.01050>
- ŽIVANOVIĆ, B., KOMIĆ, S. M., TOSTI, T., VIDOVIĆ, M., PROKIĆ, L., & JOVANOVIĆ, S. V. (2020). Leaf soluble sugars and free amino acids as important components of abscisic acid—mediated drought response in tomato. *Plants*, 9(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9091147>