



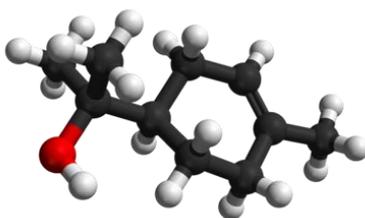
UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

*Estudio del modo de acción del  $\alpha$ -terpineol y su relación con la respuesta defensiva mediada por ácido salicílico en plantas de tomate frente a *Pseudomonas syringae**

Trabajo Fin de Máster

Curso 2021/2022



**Realizado por:**

Julia Pérez Pérez

**Directoras:**

Dra. M<sup>a</sup> Purificación Lisón Párraga

Dra. M<sup>a</sup> Pilar López Gresa

## AGRADECIMIENTOS

Tengo que empezar agradeciendo a quienes han hecho posible este trabajo, Puri y Mapi. Gracias Mapi, por haberme enseñado a que si el HPLC falla 10 veces, habrá que buscar 11 soluciones, la perseverancia y el perfeccionismo. Tu pasión por las moléculas, el metabolismo y la investigación son contagiosas. Puri, gracias por haber formado parte de uno de los años más decisivos en mi desarrollo personal. Por haber sido tan buena directora, haberme guiado y enseñado a mirar más allá. Sin ti luchando a mi lado, todo hubiera sido mucho más complicado. Gracias por tus palabras de aliento que me han ayudado a respirar. Sois un 10 en mi tribunal.

Al laboratorio. Paco, tu ayuda ha sido imprescindible, Ismael, gracias. José María, las tardes hablando de etileno y la vida se pasan más rápido.

A mis compañeros de laboratorio: Paula, Celia y Fran. Celia y Fran, aprender de vosotros ha sido un placer y habéis sido los mejores referentes. Gracias por haber estado siempre, incluso cuando había que recoger más de 300 muestras en una mañana. Celia gracias por haberme contado todo sobre la relación de *Pseudomonas* y tomate, sin ti, no habría sabido por dónde empezar. Me has allanado el camino y lo has amenizado.

Agradecer también al servicio de metabolómica, nuestras vecinas, sobre todo a Teresa, su labor. Y al CSIC, por la beca de introducción a la investigación JAE INTRO que ha sido un gran impulso y motivación en mi corto camino en la investigación.

Pero mi desarrollo personal, tanto fuera como dentro del laboratorio, tampoco hubiera sido posible sin otras personas.

Papá y Mamá, me lo habéis dado todo y lo seguís haciendo. El orgullo en vuestros ojos son mis ganas de seguir adelante y superarme a mí misma. Siempre habéis sido y seréis mi mayor apoyo. A mi pequeña gran familia, gracias.

A mis amigos, con los que he compartido tanto en un año y medio; nos hemos ayudado, hemos crecido y hemos superado todos los momentos de incertidumbre y desesperación juntos..."¿quién sube a un café rápido?", "¿quién come?", "¿alguien hace algo al salir?"...han sido mis frases motivacionales. A los que están desde hace 6 años, desde Sevilla a Valencia, gracias.

Miguel, "Compta amb mi en els dies de lluita" y en los de risa, dentro y fuera del laboratorio, gracias por todo. Siempre serás mi mejor colaboración.

**Pero esto no es un adiós, y esa es la mejor parte.**

## RESUMEN

En respuesta a un estrés biótico, las plantas sintetizan compuestos que limitan el crecimiento de los patógenos. Estos compuestos pueden actuar de forma indirecta, como moléculas señal activando las defensas vegetales. Tal es el caso de algunos compuestos orgánicos volátiles (VOCs).

Un análisis metabolómico no dirigido permitió la identificación de varios VOCs diferenciales, tales como el monoterpenoide hidroxilado  $\alpha$ -terpineol, emitidos por las plantas de tomate de la variedad 'Rio Grande' en respuesta a una infección avirulenta causada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv tomato (*Pst*; López-Gresa et al., 2017). Asimismo, se comprobó que plantas transgénicas *35S:MTSI*, que sobre-expresan la monoterpeno sintasa *MTSI*, sobre-producen monoterpenoides hidroxilados, tales como el  $\alpha$ -terpineol. A su vez, dichas plantas emiten menores niveles de metil-salicilato, un derivado del ácido salicílico (SA) que es la principal hormona implicada en estreses de tipo biótico (Minguillón, 2018). Dichos resultados sugerían una posible relación entre la ruta de los monoterpenoides y la del SA.

En este Trabajo Fin de Máster hemos profundizado en el estudio del modo de acción del  $\alpha$ -terpineol. Se ha comprobado que este compuesto es capaz de provocar el cierre estomático de forma independiente al SA, activar la transcripción de los genes encargados de codificar proteínas defensivas, aumentar la resistencia frente a infecciones con *Pst* y alterar los niveles de etileno en plantas de tomate. Estos resultados confirman el papel fundamental de los monoterpenoides en la activación de la respuesta defensiva en plantas de tomate y apoyan la importancia de los VOCs en la resistencia frente a enfermedades.

Por otra parte, se ha comprobado que existe una conexión entre la vía del metileritrol fosfato (MEP), de la que derivan los monoterpenoides, y la ruta del SA, mediante estudios de expresión diferencial de genes, de acumulación de metabolitos, de apertura estomática y de resistencia frente a *Pst* en plantas transgénicas que presentan niveles alterados de emisión de  $\alpha$ -terpineol (*35S:MTSI* y *RNAi:MTSI*). Dicha conexión podría ocurrir a través del 2-C-metil-d-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcPP), que produciría la activación del gen *ICS*, que codifica la enzima implicada en la biosíntesis del 90% del SA en las plantas, puesto que empleando un inhibidor de la ruta MEP se ha observado la inhibición de la expresión de dicho gen.

Los resultados del presente Trabajo de Fin de Máster parecen indicar que existe un *cross-talk* negativo entre la respuesta defensiva mediada por los monoterpenoides y la mediada por SA. De esta forma, tratamientos exógenos con  $\alpha$ -terpineol mejoran la resistencia de plantas de tomate frente a *Pst*, mientras que la modificación de la producción endógena de monoterpenoides lleva consigo una alteración en los niveles de SA, produciendo efectos contrarios sobre la respuesta defensiva.

## ABSTRACT

Under biotic stress, plants synthesize compounds that interfere with pathogens growth. They can act indirectly as signaling molecules, triggering defensive responses. Volatile organic compounds (VOCs) belong to this group.

Using a non targeted metabolomic analysis we identified VOCs that were differentially emitted by 'Rio Grande' tomato variety in response to an avirulent infection with *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, including the hydroxylated monoterpeneoid  $\alpha$ -terpineol (*Pst*; López-Gresa et al., 2017). Furthermore, we confirmed that transgenic plants *35S:MTSI* overexpressing the monoterpene synthase *MTSI* overproduced hydroxylated monoterpeneoids such as  $\alpha$ -terpineol. Besides, these plants emitted lower levels of methyl salicylate which is implicated in biotic stress (Minguillón, 2018). These results suggest a connection between the monoterpeneoids and the salicylic acid (SA) biosynthesis pathway.

This Project has the aim to identify the mode of action of  $\alpha$ -terpineol. We observed that treatments with this compound close the stomata in a SA-independent manner, activate the transcription of defensive genes, and enhance the resistance upon a virulent infection with *Pst*. These results confirm the key role of monoterpeneoids in the activation of the defensive response and support the importance of VOCs in the resistance of plants.

Moreover, we proved that there is a connection between the MEP pathway, leading to the production of monoterpeneoids, and the biosynthesis of SA. For this purpose, we performed analysis of differential expression of genes, metabolomics analysis, stomata aperture analysis and resistance test in transgenic plants with altered levels of monoterpeneoids (*35S:MTSI* and *RNAi:MTSI*). This connection could be caused through the MEcPP-dependent activation of *ICS*, the key gene for SA biosynthesis.

Thus, we observed a possible cross-talk between the production of monoterpeneoids and the main hormone of the plants defensive response SA. Chemical treatment with  $\alpha$ -terpineol improve the tomato plant resistance upon a virulent infection whilst the modification of the monoterpeneoid endogenous production produces an alteration in SA levels causing contrary effects in the defensive response.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	9
1. EL ESTRÉS BIÓTICO Y LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO.....	9
2. <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> : SISTEMA MODELO EN LA RESPUESTA DEFENSIVA.....	10
2.1 El reconocimiento inespecífico: PTI.....	11
2.2 El reconocimiento específico: ETI.....	12
2.3 El cierre estomático y su implicación en la respuesta defensiva.....	13
3. METABOLITOS IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO ...	14
3.1 COMPUESTOS FENÓLICOS: EL ÁCIDO SALICÍLICO.....	15
3.1.1 Metabolismo del SA:.....	15
3.1.2 Implicación del SA en la defensa de las plantas: .....	16
3.2 MONOTERPENOIDES: $\alpha$ -TERPINEOL.....	17
3.2.1 Metabolismo de los monoterpenoides:.....	17
3.2.2 Implicación de los monoterpenoides en la defensa de las plantas:.....	19
ANTECEDENTES.....	20
OBJETIVOS .....	21
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
1. MATERIAL VEGETAL Y MICROBIOLÓGICO.....	22
1.1 Germinación de semillas .....	22
1.2 Condiciones de cultivo de las plantas en invernadero.....	22
2. TRATAMIENTOS CON MONOTERPENOIDES Y FOSMIDOMICINA.....	23
3. RECOGIDA DE MUESTRA.....	23
4. INFECCIONES CON <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> .....	23
4.1 Preparación del inóculo.....	23
4.2 Infección.....	24
4.3 Conteo bacteriano.....	24
5. ESTUDIO DE LA APERTURA ESTOMÁTICA .....	25
6. MEDIDA DE LA EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS POR RT-qPCR .....	25
6.1 Extracción RNA .....	25
6.2 Precipitación RNA .....	25
6.3 Tratamiento con DNAasa.....	26
6.4 Cuantificación RNA.....	26
6.5 Retrotranscripción .....	26
6.6 Amplificación cuantitativa de cDNA.....	26

7. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	27
8. MEDIDA DE LOS NIVELES DE ETILENO .....	28
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
1. PAPEL DEL SA EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE $\alpha$ -TERPINEOL .....	29
1.1 Papel del SA en el cierre estomático mediado por $\alpha$ -terpineol .....	29
1.2 Papel del SA en la resistencia a bacteria mediada por $\alpha$ -terpineol.....	30
1.3. Papel del SA en la inducción de la biosíntesis de $\alpha$ -terpineol tras una infección bacteriana .....	32
2. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DEL MODO DE ACCIÓN DEL $\alpha$ -TERPINEOL Y LA RESPUESTA DEFENSIVA MEDIADA POR SA MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS CON NIVELES ALTERADOS DE <i>MTS1</i> .....	33
2.1 EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE <i>MTS1</i> EN LA RESPUESTA DEFENSIVA MEDIADA POR SA EN PLANTAS DE TOMATE.....	33
2.1.1 Estudio del cierre estomático en las plantas transgénicas <i>35S:MTS1</i> .....	33
2.1.2 Estudio de la resistencia ante una infección bacteriana de las plantas transgénicas <i>35S:MTS1</i> .....	35
2.1.3 Estudio de los niveles de etileno en las plantas transgénicas <i>35S:MTS1</i> .....	36
2.1.4 Estudio de los niveles de expresión de genes implicados en el metabolismo y la señalización del SA en las plantas transgénicas <i>35S:MTS1</i> .....	37
2.1.5 Estudio de los niveles de acumulación de SA y GA en las plantas transgénicas <i>35S:MTS1</i> .....	40
2.1.6 Estudio de los niveles de estrés oxidativo en las plantas transgénicas <i>35S:MTS1</i> .....	43
2.2 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE <i>MTS1</i> EN LA RESPUESTA DEFENSIVA MEDIADA POR SA EN PLANTAS DE TOMATE.....	45
2.2.1 Estudio de la resistencia ante una infección bacteriana de las plantas transgénicas <i>RNAi:MTS1</i> .....	45
2.2.2 Estudio de los niveles de acumulación de SA y GA en las plantas transgénicas <i>RNAi:MTS1</i> .....	46
3 PAPEL DE LA RUTA DEL MEP EN LA RESPUESTA DEFENSIVA DE PLANTAS DE TOMATE FRENTE A <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> MEDIANTE TRATAMIENTO CON SU INHIBIDOR FOSMIDOMICINA.....	47
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	51
CONCLUSIONES .....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	53
ANEXOS.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: Ácido Abscísico

Avr: Factor de avirulencia

B-Zips: Factores de transcripción de cremallera de leucina

CAT: Catalasa

CFU: Unidades formadoras de colonias

CHI1: Chalcona isomerasa

COR: Coronatina

DMAPP: Dimetilalil Pirofosfato

DXS: Reductoisomerasa 1-Desoxi 5-O-fosfono-D-xilulosa

EDS1: Enhanced Disease Susceptibility

ET: Etileno

ETI: Effector-Triggered Immunity

FLS2: Flagellin-sensitive 2

FPP: Farnesil Pirofosfato

FSM: Fosmidomicina

GA: Ácido Gentísico

GGPP: Geranilgernil Pirofosfato

GPP: Geranil Pirofosfato

GS-MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

HB: Butanoato de (Z)-3-hexenilo

HDS: 1-hidroxi-2-metil-2-butenil-4-difosfato sintasa

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

HR: Reacción Hipersensible

Hrp: Respuesta Hipersensible Patogénica

ICS: Isocorismato Sintasa

IPP: Isopentenil Pirofosfato

JA: Ácido Jasmónico

LB: Luria Bertani medio

LRR: Repeticiones Ricas en Leucina

MAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Microbios

MEcPP: 2-C-metil-d-eritritol-2,4-ciclodifosfato

MEP: Metileritritol fosfato

MM: MoneyMaker

MTS1: Monoterpeno Sintasa 1

MVA: Ácido Mevalónico

NO: Óxido Nítrico

NPR1: Nonexpresser of Pathogenesis Related Proteins

PAL: Fenilalanina Amonio Liasa

PAMPs: Patrones Moleculares asociados a patógenos

POD: Peroxidasa

PRRs: Receptores de Reconocimiento Patogénico

PRs: Proteínas-relacionadas con la Patogénesis

Pst: *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000

PTI: PAMP Triggered

R: Gen de resistencia

RG: 'Rio Grande'

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

S5H: Salicilato 5- Hidroxilasa

SA: Ácido Salicílico

SAM-T: S-Adenosil-L-metionina; ácido salicílico carboxil metiltransferasa

SAR: Resistencia Sistemática Adquirida

SOD: Superóxido Dismutada

T3SS: Sistema de Secreción Tipo III

T-Ca: Trans Cinámico

TPS: Terpeno Sintasa

VOCs: Compuestos Volátiles Orgánicos

## ÍNDICE DE FIGURAS:

<b>Figura 1:</b> Modelo en zig-zag del sistema defensivo de las plantas-----	11
<b>Figura 2:</b> Modelo del cierre y apertura estomática mediada por Pst. -----	14
<b>Figura 3:</b> Modelo simplificado de la biosíntesis de SA-----	16
<b>Figura 4:</b> Rutas de biosíntesis de los monoterpenos. -----	18
<b>Figura 5:</b> Efecto del tratamiento con $\alpha$ -terpineol en la apertura estomática en plantas transgénicas de tomate NahG y su parental MoneyMaker-----	29
<b>Figura 6:</b> Efecto del tratamiento con $\alpha$ -terpineol en el crecimiento bacteriano en plantas de tomate transgénicas NahG y su parental MoneyMaker-----	31
<b>Figura 7:</b> Expresión de los genes MTS1, ICS y PAL en plantas de tomate de tomate transgénicas NahG y su parental MoneyMaker -----	32
<b>Figura 8:</b> Efecto de la sobreexpresión del gen MTS1 en la apertura estomática en plantas transgénicas de tomate 35S:MTS1 (verde) y su parental (pGreen; gris)-----	34
<b>Figura 9:</b> Crecimiento de Pst en plantas plantas transgénicas de tomate 35S:MTS1 (verde) y su parental (pGreen; gris), 24 h después de la infección-----	36
<b>Figura 10:</b> Niveles de etileno en hojas de plantas de tomate transgénicas 35S:MTS1 (verde) y su parental (pGreen; gris), sin infectar (mock) e infectadas tras 24 h con Pst (24 hpi Pst)-----	36
<b>Figura 11:</b> Niveles de expresión de los genes ICS (A), EPS1 (B) y PR1 (C) relacionado con la biosíntesis y señalización del SA en plantas transgénicas 35S:MTS1 (verde) y su parental (pGreen; gris), tanto en plantas sin infectar (mock) e infectadas tras 24 h de infección con Pst (24 hpi Pst)-----	38
<b>Figura 12:</b> Niveles de expresión de los genes SAM-T y S5H relacionados con la degradación del SA en plantas transgénicas 35S:MTS1 (verde) y su parental pGreen (gris, tanto en plantas mock sin infectar e infectadas tras 24 h de infección con Pst-----	39
<b>Figura 13:</b> Medidas de los niveles de ácido salicílico (SA) y gentísico (GA) en plantas de tomate transgénicas 35S:MTS1 y su parental pGreen, mock e infectadas 24 h con Pst-----	42
<b>Figura 14:</b> Niveles de expresión de los genes POD (A), CAT (B) y SOD (C) relacionados con el estrés oxidativo en plantas de tomate transgénicas 35S:MTS1 (verde) y su parental (gris) en plantas sin infectar (Mock) e infectadas tras 24h de infección con Pst (24 hpi Pst)-----	43
<b>Figura 15:</b> Crecimiento de Pst en plantas plantas transgénicas de tomate RNAi_MTS1 (líneas 5.1 y 6.1) y su parental ('Rio Grande', RG; gris) 24 h después de la infección-----	45
<b>Figura 16:</b> Medidas de los niveles de ácido salicílico (SA) y gentísico (GA) en plantas de tomate iRNA_MTS1 (5.1, 6.1) y su parental 'Rio Grande', infectadas 24 h con Pst-----	46
<b>Figura 17:</b> Niveles de expresión de los genes MTS1 e ICS en plantas tratadas con fosmidomicina (FSM; rosa) y no tratadas (mock; gris) infectadas 24 h con Pst-----	47
<b>Figura 18:</b> Crecimiento de Pst en plantas plantas sin tratar (mock; gris) y tratadas con Fosmidomicina (FSM; rosa) 24 h después de la infección-----	48
<b>Figura 19:</b> Modelo final propuesto que ilustra la conexión entre la ruta MEP y la biosíntesis del SA-----	50

# INTRODUCCIÓN

## 1. EL ESTRÉS BIÓTICO Y LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Las plantas terrestres conquistaron nuestro mundo hace, aproximadamente, 450 millones de años. Desde entonces, han evolucionado para sobrevivir a un ambiente cambiante y, en ocasiones, muy adverso, sufriendo un sinnúmero de transformaciones. Las plantas son organismos sésiles, lo que explica muchos de sus comportamientos. Además, sus tejidos son muy nutritivos y son fuente de alimentación de hongos y bacterias.

Las plantas han desarrollado escudos que las protegen: paredes reforzadas, espinas, aislantes... junto con la capacidad de generar productos tóxicos de defensa como proteínas y metabolitos. A su vez, los microorganismos superan estas barreras rompiendo las protecciones externas, aprovechando los puntos de entrada de las plantas e incluso sintetizando compuestos que debilitan a las plantas convirtiéndolas en más sensibles a las enfermedades. Los daños producidos por patógenos son una de las principales causas que reducen la productividad de los cultivos de interés agronómico. Para paliar estas pérdidas, es necesario comprender los mecanismos de defensa y cómo las plantas resisten a las enfermedades.

Los mecanismos defensivos vegetales se clasifican como respuesta innata e inducible. Es la discriminación entre lo propio y lo ajeno lo que produce la activación del sistema inmune inducible con el fin de evitar la infección patogénica.

En las plantas se han caracterizado varios tipos de resistencia inducible sistémica entre los que destacan: 1) la resistencia sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR), que se activa tras la infección de las plantas por patógenos (Gao et al., 2015); 2) la resistencia sistémica inducida (*Induced Systemic Resistance*, ISR), que es activada tras la colonización de las raíces por determinadas cepas bacterianas de la rizosfera (Choudhary et al., 2007); 3) la resistencia inducida por herida (*Wound Induced Resistance*, WIR), que puede ser activada tanto por las heridas que causan en el tejido vegetal los insectos masticadores como por el daño mecánico y 4) y la PTI (PAMP Trigger Immunity) que se activa por MAMPS/PAMPS (*Microbe/Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Jones y Dangl, 2006).

Tras las infecciones patogénicas se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) que reducen la expansión del patógeno por los tejidos vegetales (Belete, 2021). Además, las plantas aumentan la lignificación de sus paredes para evitar la invasión y reducir la susceptibilidad. Por otra parte, producen compuestos químicos, proteínas y enzimas de resistencia como las proteínas PR (*Pathogenesis-related*) que aumentan su expresión de forma muy abrupta frente a un ataque (Madani et al., 2018). Conjuntamente se activan rutas hormonales como las del ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) o etileno (ET) que toman un papel central en la señalización del estrés biótico (Alazem y Na-Sheng, 2015). También la fitohormona ácido abscísico (ABA) implicada fundamentalmente en procesos de desarrollo y crecimiento, participa en la respuesta adaptativa a estreses bióticos y abióticos. En concreto, la acumulación de SA y ABA, activa un gran número

de proteínas reguladoras y factores de transcripción, que aumentan la resistencia de las plantas frente a patógenos al provocar el cierre estomático (Velázquez et al., 2017).

Los patógenos bacterianos y fúngicos se clasifican según su modo de nutrición como necrotrofos, biotrofos o hemibiotrofos. Los necrotrofos son parásitos facultativos que pueden sobrevivir sobre materia orgánica muerta y dañan la planta gravemente hasta la necrosis del tejido por una alta producción de toxinas y enzimas degradativas. No presentan estructuras específicas de parasitismo y tienen un amplio rango de hospedadores. Sin embargo, los biotrofos son parásitos obligados que requieren de hospedadores vivos para sobrevivir y no suelen producir graves daños en el huésped. En general, producen pocas toxinas y enzimas degradativas e invaden una reducida variedad de hospedadores. Adicionalmente, pueden penetrar por abrasiones o heridas en las hojas o raíces, provocadas por insectos. Dentro del tejido, proliferan en el apoplasto, en los espacios intercelulares o en los vasos xilemáticos y se expanden así por todo el tejido vegetal (Singh et al., 2018). Por último, los patógenos hemibiotrofos alternan una fase de crecimiento biotrofo, y una fase necrotrofa en estadios tardíos de la infección.

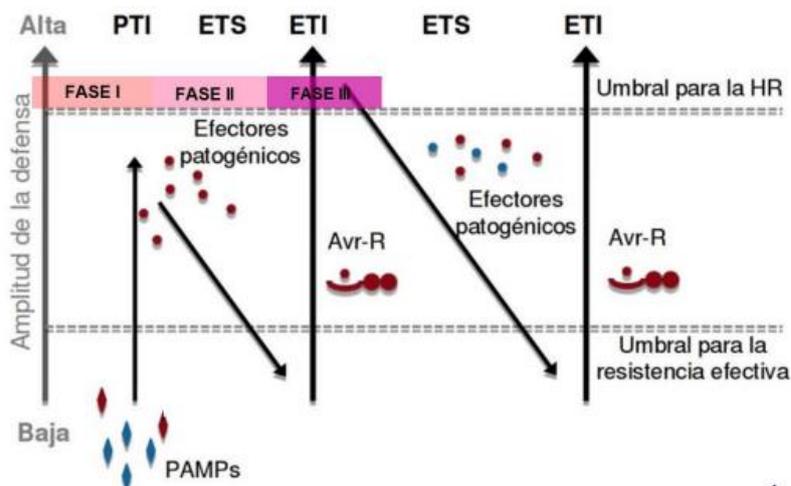
## 2. *PSEUDOMONAS SYRINGAE*: SISTEMA MODELO EN LA RESPUESTA DEFENSIVA

*Pseudomonas syringae* DC3000 pv. *tomato* (*Pst*) es uno de los patógenos hemibiotrofos mejor estudiados como modelo para comprender la interacción planta-patógeno, la patogenicidad bacteriana, los mecanismos moleculares implicados en la interacción, etc. Se aisló por primera vez de plantas enfermas y se comprobó que infecta a un gran número de especies de interés agronómico. Las principales características de esta bacteria son que se trata de una bacteria Gram-negativa, aerobia estricta, en forma de bastón y con flagelos polares (Hirano y Upper, 2000).

*Pst* tiene dos fases de crecimiento: la epífita, en la que la bacteria vive en la superficie externa del tejido vegetal y la endofítica, cuando la bacteria penetra en el tejido y coloniza los espacios apoplásticos provocando la enfermedad (Xin et al., 2018).

La capacidad infectiva de esta bacteria depende de los siguientes factores: 1) evadir el sistema de detección de la planta no produciendo moléculas elicitoras que lo puedan delatar 2) interferir con las respuestas de defensa, por ejemplo, eliminando los compuestos antimicrobianos; 3) poseer una alta tasa de crecimiento y 4) tener un hábito alimenticio tipo necrotrófico, mediante la producción de grandes cantidades de toxinas o enzimas que interfieren con las respuestas de defensa activa (Sanzón et al., 2011).

Las plantas, a parte del sistema inmune innato, inducen mecanismos defensivos frente a a *Pst* tras su percepción o la de sus elicitores. Este reconocimiento supone el cambio de susceptibilidad a resistencia. Según sea el tipo de reconocimiento se establecen dos vías de señalización inmune (Figura 1): si es inespecífico se activa la PTI (*PAMP Triggered Immunity*) y si tiene lugar la percepción de efectores bacterianos se produce la ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones y Dangl, 2006).



**Figura 1. Modelo en zig-zag del sistema defensivo de las plantas.** En la fase I, la planta reconoce los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de los PRRs (Pattern Recognition Receptors). Se activa la inmunidad PTI. En la fase II, los patógenos producen efectores que pueden interferir con la PTI y provocan susceptibilidad desencadenada por el efector (Effector-Triggered Susceptibility, ETS). En la fase III, el factor de avirulencia Avr patogénico es reconocido por una proteína R vegetal y se activa la inmunidad ETI que puede provocar la respuesta hipersensible (HR) (Adaptación de Jones y Dangl, 2006).

## 2.1 El reconocimiento inespecífico: PTI

En el primer contacto entre la planta y la bacteria patógena, la planta puede detectar y reconocer de forma inespecífica los PAMPs. Este reconocimiento activa una cascada de transducción de señales que provoca la activación de las defensas basales de la planta (PTI), como, por ejemplo, el cierre estomático, la producción de ROS o ET y la activación transcripcional de genes como *PR* (Melotto et al., 2006). Estas respuestas se activan por los receptores extracelulares de las plantas que suelen conservar un dominio rico en leucina (*Leucin- Rich Repeats*, LRR) extracelular y un dominio quinasa intracelular. En general, estas defensas basales suelen bastar, para evitar el crecimiento del patógeno y prevenir su crecimiento (PTI; Figura 1).

Uno de los PAMPs más estudiados es la flagelina; un componente del flagelo bacteriano, que es reconocido por receptores tipo LRR quinasa como el FLS2 (*Flagellin sensing 2*). Este reconocimiento provoca la activación de cascadas de MAPK que provocan la señalización por SA, desembocando en el cierre estomático. El receptor FLS2, que se

expresa en células epidérmicas, mesófilas y guarda, activa la respuesta de defensa temprana y evita la penetración masiva de la bacteria en los tejidos (Zeng y He, 2010).

## 2.2 El reconocimiento específico: ETI

Como producto de la evolución, algunos patógenos producen efectores, denominados factores de avirulencia (*Avr*), que les permiten superar este primer nivel de respuesta defensiva PTI, ocasionando la susceptibilidad desencadenada por el efector (*Effector-Triggered Susceptibility*, ETS). Y a su vez, las plantas se han adaptado mediante la síntesis de genes de resistencia (*R*) que reconocen dichos efectores. La resistencia de la planta frente a enfermedades dependerá entonces de esta interacción gen-a-gen (Mishina y Zeier, 2007). Si se establece exitosamente dicha interacción no se desarrollará la enfermedad dando lugar a lo que se conoce como interacción incompatible, o inmunidad activada por efectores (ETI; Figura 1), mientras que si no interaccionan *R-Avr* el patógeno se propagará de forma exitosa por la planta desencadenando la interacción compatible (Hurley et al., 2014).

El sistema gen-a-gen es posible por la codificación, por parte de los genes *R*, de receptores intracelulares. El reconocimiento de una proteína *Avr* por una *R* provoca una serie de respuestas defensivas que permiten la autoprotección de la planta. La mayoría de las proteínas *R* contienen un sitio de unión a DNA y el dominio LRR (Narusaka et al., 2009). La activación de *R* conduce a la muerte celular programada de las células infectadas gracias a la activación de la respuesta hipersensible (HR) en el tejido infectado (Klessig et al., 2018), consistente en la generación de ROS, aumento en los niveles de  $Ca^{2+}$ , síntesis de fitoalexinas, reprogramación transcripcional y la acumulación de SA libre. Estas proteínas *R* activan una señalización mediada por MAPKs, que participan en la transmisión de la señal extracelular al núcleo donde factores de transcripción como los WRKY se unen a elementos regulatorios *cis*, reprograman la expresión de genes y provocan alteraciones a nivel proteómico para coordinar la defensa frente al patógeno concreto. Esta respuesta va acompañada, generalmente, de la acumulación de las proteínas PR y del SA, junto con el desarrollo de SAR y permiten una respuesta mayor y más rápida frente a una segunda infección (ETI; Figura 1).

Uno de los sistemas planta-patógeno más característicos en tomate es la interacción establecida entre la variedad 'Rio Grande' portadora del gen de resistencia *Pto* y la bacteria *Pst* portadora del gen de avirulencia *AvrPto*. En este tipo de interacción, se produce el reconocimiento específico entre el factor codificado por el gen *Pto* y el efector *AvrPto* desencadenándose la ETI.

*Pst* ha evolucionado y sintetizado factores defensivos como la fitotoxina coronatina (COR). La COR imita la forma activa del ácido jasmónico (JA-Ile), pudiéndose unir también a su receptor COI1 (Yan et al., 2009). Dicha unión lleva consigo la formación de complejos JAZ-COI1, desencadenando la degradación de los represores JAZ a través del proteosoma 26S (Chini et al., 2007) y, por tanto, activando la transcripción de los genes dependientes de JA a través de los factores de transcripción MYCs.

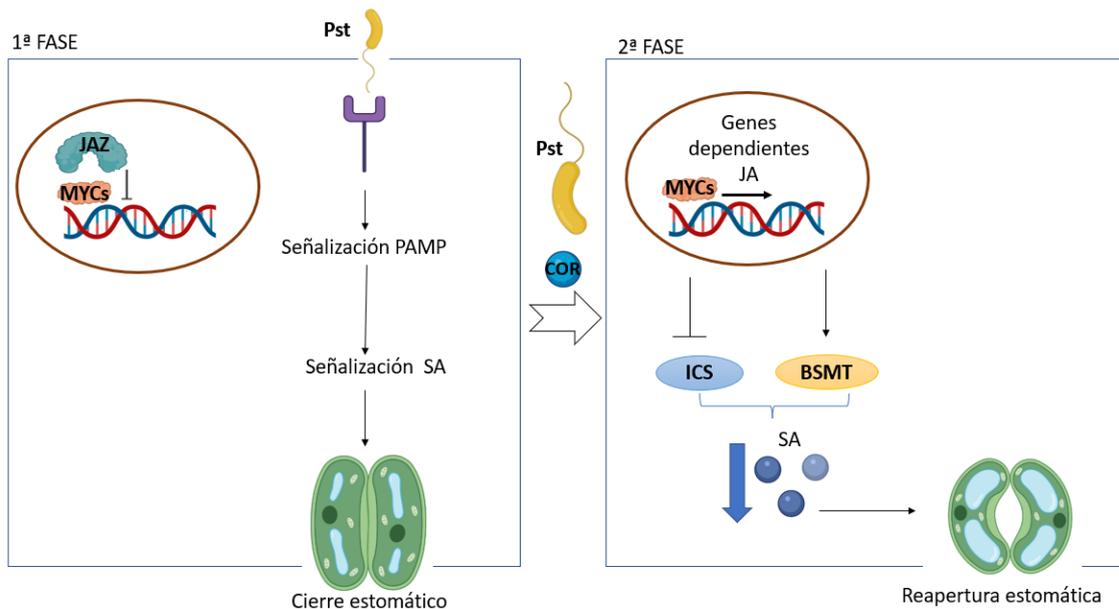
Puesto que el SA y el JA actúan como reguladores positivo y negativo del cierre estomático, respectivamente (Melotto et al., 2017), la percepción de COR activaría en la planta el antagonismo entre ambas moléculas señal, produciendo la reapertura estomática mediada por factores de transcripción en tomate (Gimenez-Ibañez et al., 2017). Dicha reapertura permitiría una mayor entrada de la bacteria, cuya vía principal de acceso a la planta son precisamente los estomas (Figura 2).

### 2.3 El cierre estomático y su implicación en la respuesta defensiva

Las plantas han desarrollado mecanismos innatos, que forman parte de la primera línea defensiva, denominada pasiva, para reducir la entrada de *Pst* por los estomas. (War et al., 2012).

Los estomas son poros microscópicos que se encuentran en la parte aérea de las plantas y su función principal es el intercambio gaseoso que permite la transpiración y la fotosíntesis. De forma indirecta, están implicados en la defensa de la planta ya que suponen una vía de entrada para patógenos como bacterias que colonizan los tejidos vegetales. Se ha comprobado que los estomas tienen un papel activo en esta defensa al percibir el patógeno e inducir su cierre provocando la evasión de su entrada masiva (Figura 2). Como consecuencia la carga patogénica se mantiene en la superficie donde se dan condiciones hostiles para su supervivencia. Este proceso supone una disminución en la severidad de la enfermedad (Melotto et al., 2009).

Cuando la planta reconoce los PAMPs de *Pst*, tales como la flagelina, una cascada de señalización se activa en las células guarda del estoma para provocar su cierre como parte de la PTI. Se ha descrito que hormonas como el SA o el ABA están implicadas en este cierre. Mientras que el SA es la hormona que se acumula en infecciones biotrofas como es la de *Pst*, el ABA es la hormona implicada en el cierre estomático en respuesta a las condiciones ambientales. Por tanto, el ABA también modula la respuesta defensiva de la planta frente a estreses bióticos y abióticos (Zeng y He, 2010). Por su parte, tal y como se ha mencionado, tanto la COR como el JA actuarían en el sentido contrario, provocando la reapertura estomática. Así pues, mutantes de *Pst* incapaces de producir COR son menos virulentos (Melotto et al., 2017).



**Figura 2. Modelo del cierre y apertura estomática mediada por *Pseudomonas syringae* (*Pst*).** *Pst* penetra en la hoja de la planta a través de los estomas que están abiertos de forma natural. (1ª Fase) Los PAMP bacterianos estimulan la señalización inmunitaria que activa la síntesis y señalización del SA y se cierran los estomas. (Fase 2ª) Para contrarrestar esto, la fitotoxina coronatina (COR) provoca la degradación de los represores JAZ y se activa la señalización de JA a través de los factores MYCs. Esta activación provoca la inhibición de la isocorismato sintasa (ICS) y la activación de la salicilato/benzoato carboxil metiltransferasa (BSMT1), que participan en la biosíntesis y la degradación del SA, respectivamente. Esto provoca una disminución drástica en los niveles de SA que conlleva la reapertura estomática.

Por tanto, la regulación del cierre estomático constituye un mecanismo de defensa de las plantas frente a *Pst*, estando regulado por diferentes moléculas señal que forman parte del metabolismo secundario de las plantas.

### 3. METABOLITOS IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Las plantas sintetizan compuestos defensivos que interfieren con los patógenos afectando a su patogenicidad. Estos compuestos suelen actuar de forma directa provocando la muerte del patógeno por toxicidad; tal es el caso de los compuestos antibacterianos (Pang et al., 2021). Pero también, pueden actuar de forma indirecta, como moléculas señal activando las defensas vegetales, como estimulantes para las bacterias beneficiosas que habitan en la superficie de las hojas o como inhibidores de la activación de las enzimas degradativas liberadas por los patógenos, entre otros.

Las plantas, desde las hojas y raíces, liberan constantemente exudados orgánicos y volátiles. Muchos de los compuestos mencionados, forman parte del metabolismo secundario de las plantas, consistente en la síntesis en menor cantidad de moléculas sin función directa en los procesos esenciales del desarrollo (Teo et al., 2015). Dentro de la gran variedad de funciones de estos metabolitos, encontramos productos que atraen y repelen animales, pigmentos que dan color a flores y frutos (atraen insectos polinizadores), compuestos que protegen a las plantas frente a predadores (como

repelentes, que dan sabor amargo a las plantas o que las hacen indigestas), entre otros (Negre-Zakharov et al., 2009).

Por su interés en este trabajo, nos centraremos en dos tipos de metabolitos secundarios: los compuestos fenólicos simples (SA) y los monoterpenos ( $\alpha$ -terpineol).

### 3.1 COMPUESTOS FENÓLICOS: EL ÁCIDO SALICÍLICO

El SA es un compuesto fenólico simple que está implicado en la activación de las defensas de la planta por su implicación en la SAR (Klessig et al., 2018). El SA induce proteínas defensivas PR y es la hormona encargada de modular la respuesta defensiva ante patógenos de tipo biótrofo (Glazebrook, 2005), como es el caso de *Pst*. Además, interacciona con otras hormonas como el ET o el JA, su principal antagonista (Phuong et al., 2020) que se sintetiza para frenar el ataque de herbívoros y patógenos necrotrofos.

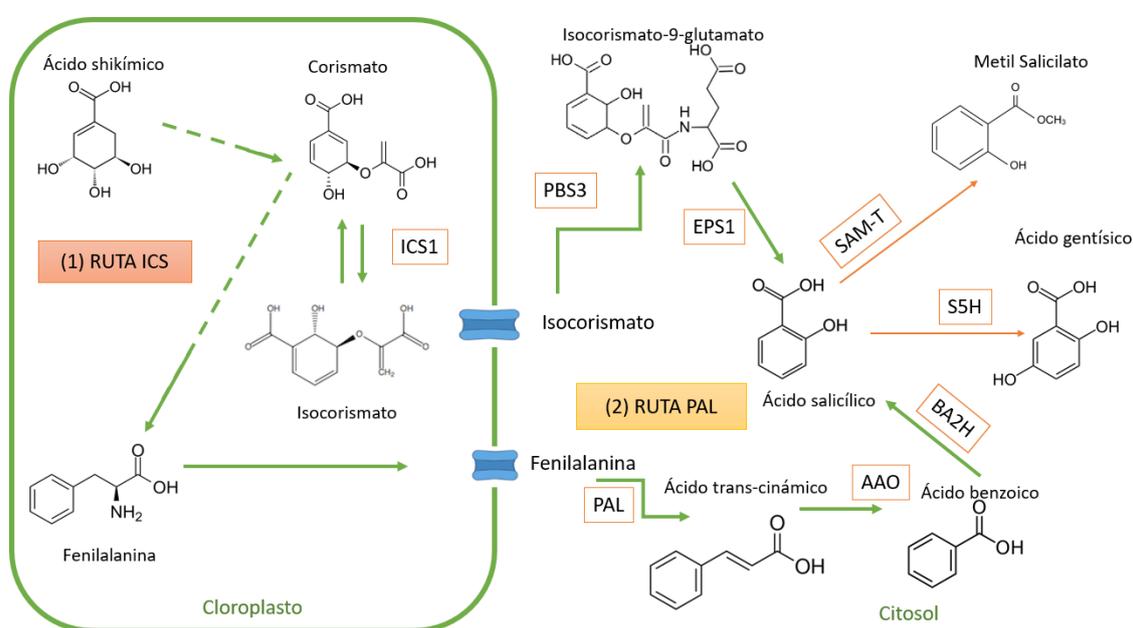
#### 3.1.1 Metabolismo del SA:

El SA (o ácido 2-hidroxibenzoico) se sintetiza en los plastos a partir de dos rutas con un sustrato común: el corismato, que es el producto de la ruta del shikimato (Figura 3). Las dos rutas son dependientes de dos enzimas limitantes diferentes: la isocorismato sintasa (ICS) que produce más del 90% del SA frente a señales de estrés (Wildermuth et al., 2001) y la fenilalanina amonio liasa (PAL). La enzima PAL convierte la fenilalanina en ácido trans-cinámico (t-CA) que puede convertirse en SA directamente (Lee et al., 1995). Se ha comprobado que PAL puede estar relacionada con estreses bióticos porque se induce frente a patógenos. Sin embargo, mutantes de *PAL* en *Arabidopsis* únicamente muestran un descenso del 50% en la acumulación de SA frente a patógenos, indicando que es ICS el principal enzima implicado en la síntesis de SA en respuesta a estrés (Huang et al., 2010). Así pues, en la ruta del plasto, ICS convierte el corismato en isocorismato, que sale por un transportador al citosol donde se conjuga al glutamato por la isocorismil glutamato sintasa PBS3. Posteriormente, el gen *EPS1* codifica una BADH aciltransferasa que produce SA a partir del isocorimato-9-glutamato. Se ha comprobado que mutantes *knock-out* de este gen son susceptibles a *Pst* debido a una menor acumulación de SA (Torrens-Spence et al., 2019).

El SA se modifica muy rápidamente por diferentes vías incluyendo glicosilaciones, metilaciones, conjugaciones con aminoácidos, hidroxilaciones etc (Kumar, 2014). Dichas modificaciones permiten: 1) regular los niveles de SA biológicamente activo en el citoplasma, 2) proveer un reservorio de SA transportable o rápidamente modificable en respuesta a estrés y 3) disminuir la toxicidad del SA que puede provocar la muerte celular (Lowe-Power et al., 2016).

El SA se almacena de forma glucosilada en las vacuolas, de tal manera que, cuando se produce el estrés, las  $\beta$ -glucosilasas rompen el enlace liberando el SA a su forma libre que es la activa. Además, el SA puede metilarse por la acción de SAM-T formando el MeSA (metil salicilato) que es un compuesto volátil y que difunde fácilmente por las

membranas comportándose como una molécula señal que permite la comunicación entre plantas vecinas (Dempsey et al., 2011). Asimismo, la hidroxilación del SA por la acción de S5H da lugar al ácido gentísico (2,5-dihidroxi-benzoico, GA). Se ha propuesto que el GA tiene una función defensiva alternativa al SA, puesto que se acumula a altos niveles en plantas infectadas con distintos patógenos (Bellés et al., 1999; López-Gresa et al., 2016; López-Gresa et al., 2017; López-Gresa et al., 2019) y tratamientos exógenos con dicho derivado del SA producen la activación de PRs, así como la inducción de mecanismos de silenciamiento y un aumento de la resistencia (Bellés et al., 1999; Campos et al., 2014). Del mismo modo que el SA; el GA se acumula en forma glicosilada (Tárraga et al., 2010).



**Figura 3. Modelo simplificado del metabolismo del SA.** Se representan los intermediarios y las enzimas claves del proceso. Con flechas verdes se muestran las dos rutas principales de biosíntesis de SA en plantas: (1) la ruta del isocorismato sintasa (ICS) cloroplástica y (2) la ruta de la fenilalanina amonion liasa (PAL) citosólica. Ambas comienzan con el corismato como sustrato que se produce por la vía del shikimato desde el fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato (no mostrado). (1) Ruta IC en cloroplasto: bajo un estrés, ICS convierte el corismato en isocorismato en el plasto. El isocorismato sale por un transportador al citosol y se convierte a isocorismato-9-glutamato por la isocorismil glutamato sintasa PBS3. Posteriormente, se convierte en SA de forma espontánea y el proceso se mejora por la implicación de EPS1. (2) Ruta PAL en citosol: la fenilalanina producida a partir del corismato en el plasto se transporta hasta el citosol se convierte en ácido trans-cinámico mediante la enzima PAL. Este se convierte en ácido benzoico que se hidroxila por BA2H para producir SA. Por otra parte, con flechas naranjas se representan las dos enzimas de degradación del SA; SAM-T y S5H que lo convierten en metil salicilato y ácido gentísico respectivamente.

### 3.1.2 Implicación del SA en la defensa de las plantas:

El SA se comporta como una molécula señal en muchos procesos fisiológicos en respuesta a estrés como son el cierre estomático, la termogénesis, la sequía etc.

Una de las proteínas clave en la señalización por SA es NPR1 (*Nonexpresser of Pathogenesis-Related protein 1*). No se considera un receptor porque no interacciona físicamente con el SA, pero su sobreexpresión aumenta la resistencia frente a enfermedades en tomate y otras especies (Yang y Dong, 2014). Los cambios en los niveles citosólicos de esta hormona hacen que los oligómeros de NPR1 se conviertan en monómeros y migren hasta el núcleo, donde interacciona con factores de transcripción, que activan la síntesis de proteínas defensivas, incluyendo las PRs. En un estado basal, NPR1 se degrada fácilmente para minimizar la expresión de genes de defensa (Zhang et al., 1999).

El papel esencial del SA en la respuesta defensiva de las plantas fue demostrado definitivamente mediante la obtención de plantas transgénicas *NahG* incapaces de acumular SA y, por tanto, de establecer SAR (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994).

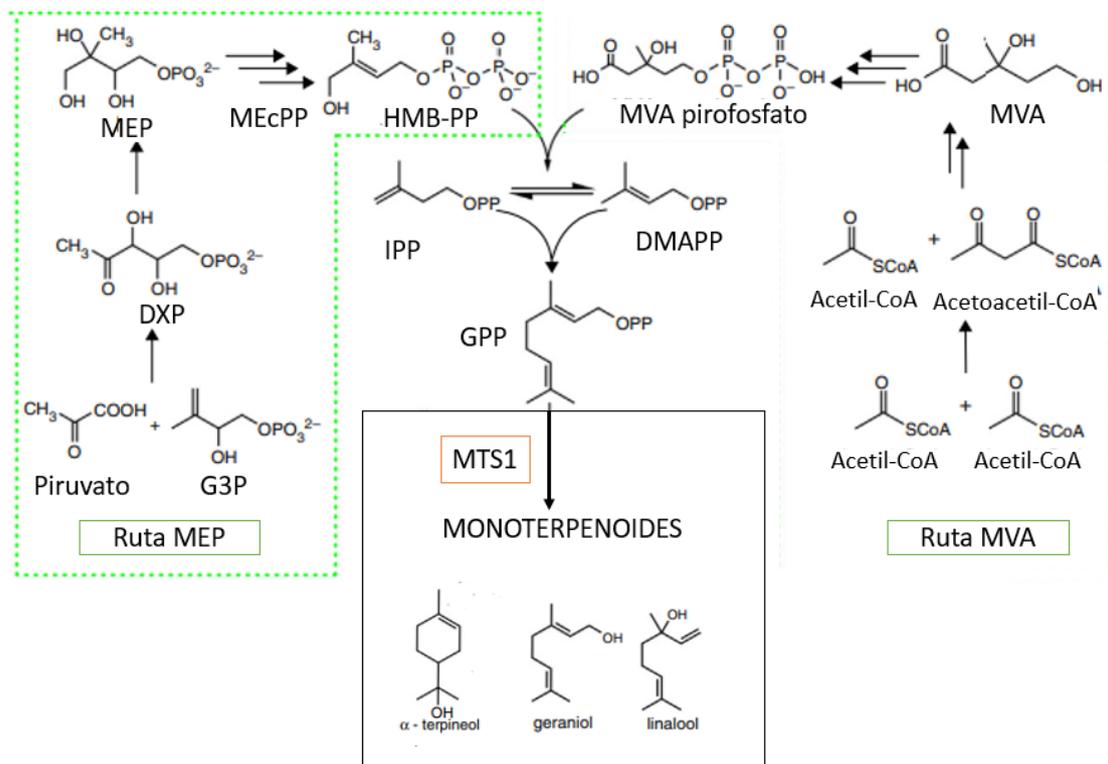
Por tanto, el SA es la molécula señal clave de la respuesta defensiva a patógenos biotrofos, tales como *Pst*, puesto que su acumulación en respuesta a una infección produce tanto la síntesis de proteínas defensivas tipo PR, como el cierre estomático.

### 3.2 MONOTERPENOIDEOS: $\alpha$ -TERPINEOL

Los monoterpenoides pertenecen a la familia de los terpenos, que son una de las clases más diversas y extensas de metabolitos secundarios. Están implicados en un gran número de funciones como la fotosíntesis (carotenoides, clorofilas etc), la respiración celular (ubiquinona), el crecimiento y desarrollo (citoquininas, esteroides etc), la defensa (fitoalexinas) o la resistencia a estreses, entre otros (Toffolatti et al., 2021; Dong et al., 2016).

#### 3.2.1 Metabolismo de los monoterpenoides:

Los terpenos derivan del isopreno (2-metil-1,3-butadieno). La unión de un número determinado de unidades de isopreno (C5) da lugar a los hemiterpenos (una unidad de isopreno), monoterpenos (dos unidades de isopreno, C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), y así sucesivamente hasta los carotenoides (C40). Los terpenos se obtienen a partir de dos rutas de biosíntesis (Figura 4): la ruta del ácido mevalónico (MVA) en el citosol y la del metileritritol fosfato (MEP) en el cloroplasto (Zebec et al., 2016). En particular, los monoterpenos hidroxilados, tales como el  $\alpha$ -terpineol, 4-terpineol y el linalool, se sintetizan a través de la ruta plastídica del MEP por la acción de terpeno sintasas (TPS), con una posterior modificación llevada a cabo a través de la actividad de las monooxigenasas del citocromo P450 (Pichersky et al., 2006).



**Figura 4. Rutas de biosíntesis de los monoterpenoides.** Ruta MEP (metileritritol fosfato) y ruta MVA (mevalonato) y representación de sus intermediarios principales. La ruta MEP comienza a partir del piruvato y gliceraldehído3-fosfato (G3P) en el cloroplasto y la ruta MVA a partir de dos acetil-CoA en el citoplasma. Ambas vías desembocan en la síntesis del precursor directo de los monoterpenos geraniol pirofosfato (GPP) que mediante la acción de la monoterpeno sintasa 1 (MTS1) se convierte en los monoterpenos y sus derivados. Adaptación de Zebec et al., 2016.

Esta biosíntesis depende de dos precursores de isopreno: el isopentenil pirofosfato (IPP) y el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) que están presentes tanto en la ruta MEP como en la MVA (Figura 4). Existen enzimas, preniltransferasas, que añaden unidades variables de IPP al DMAPP para formar todas las clases de terpenos. Ambos se condensan para formar los precursores directos de los terpenos como el geraniol pirofosfato (GPP) que es procesado por las monoterpeno sintasas para la producción de monoterpenoides. Cuando se añaden dos unidades se forma el farnesil pirofosfato (FPP) que produce los sesquiterpenos, mientras que con 3 unidades se produce el geraniogeraniol pirofosfato (GGPP), que desemboca en los diterpenos (Degenhardt et al., 2009).

Las terpeno sintasas (TPS) catalizan la síntesis de isoprenoides, siendo las responsables de la diversidad de terpenos que se encuentran en la naturaleza (Tholl y Lee, 2011). El análisis del genoma actualizado de tomate (versión 2017 de v. SL3.0) ha revelado que existen 34 genes *TPS* de longitud completa y 18 pseudogenes de *TPS*. El análisis bioquímico ha identificado las actividades catalíticas de todas las enzimas codificadas por los 34 genes de *TPS*: una sintasa del isopreno, 10 exclusivas o predominantemente sintasas de monoterpenos, 17 sintasas de sesquiterpenos y 6 sintasas de diterpenos (Zhou et al., 2020). Entre ellas, se ha descrito que la proteína recombinante de la monoterpeno sintasa MTS1 produce β-linalool a partir de GPP y β-nerolidol a partir de FPP; su gen se

induce por JA en los tricomas y por heridas e insectos y su sobreexpresión produce el aumento de los niveles de linalool en plantas de tomate (Van Schie et al., 2007).

La identificación de los genes y enzimas responsables de la biosíntesis de VOCs (monoterpenoides) ha permitido grandes avances en la ingeniería metabólica de plantas. Así pues, se ha conseguido con éxito mejorar, por una parte, la calidad del aroma de flores y frutos y, por otra, las defensas de las plantas frente a estreses bióticos (Kiyama et al., 2021).

### 3.2.2 Implicación de los monoterpenoides en la defensa de las plantas:

La gran cantidad y variedad de terpenoides que se encuentran en las plantas y su producción depende directamente de estímulos ambientales. Se ha comprobado como la sobreexpresión de un gran número de monoterpenoides está directamente asociada a diferentes mecanismos de defensa.

Una de las principales evidencias de esta implicación es la relación entre la respuesta SAR mediada por SA con los monoterpenoides. Mediante un análisis GS-MS se comprobó que plantas de *Arabidopsis*, tras la activación de la respuesta SAR, sobreemiten monoterpenos. Así pues, tratamientos con  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno inducen la inmunidad mediada por SA frente a *Pst*, provocando la acumulación de ROS y el aumento de la expresión de genes relacionados con la señalización por SA y la respuesta SAR. Además, mutantes en las enzimas de biosíntesis de monoterpenos de la ruta MEP presentan una menor respuesta defensiva SAR, indicando que los monoterpenos actúan de forma paralela al SA. Por otra parte, la liberación de estos monoterpenos induce la resistencia en plantas vecinas. Estos resultados confirman el aumento de la resistencia en plantas mediada por la liberación de monoterpenos y derivados (Riedlmeier et al., 2017).

Estas evidencias junto a experimentos previos en nuestro laboratorio demostraban la importancia de los monoterpenos en la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a *Pst*.

## ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio, empleando la plataforma analítica de GS-MS, se realizó el análisis metabolómico de los VOCs implicados en la respuesta defensiva de hojas de plantas de tomate ‘Rio Grande’ portadoras del gen *Pto* frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*). Se llevaron a cabo dos infecciones: una de ellas con una cepa de la bacteria *Pst* virulenta, que produce la enfermedad, y la otra avirulenta, en la que la planta resiste. La comparación de los metabolitos diferencialmente emitidos desveló una serie VOCs importantes en cada interacción. Se observó que la activación de la resistencia en la planta lleva consigo la emisión diferencial de ésteres del (Z)-3-hexenol, incluyendo el butanoato de (Z)-3 hexenilo (HB), así como algunos monoterpenoides, como el  $\alpha$ -terpineol, 4-terpineol y el linalool. Además, se observó una activación del gen *MTSI* en la infección avirulenta, confirmando la activación de la síntesis de monoterpenos (López Gresa et al., 2017).

Se ha demostrado el papel defensivo del HB, puesto que produce el cierre estomático impidiendo así la entrada de la bacteria y es capaz de inducir la respuesta defensiva de las plantas (López Gresa et al., 2018). Dicho compuesto ha sido patentado y licenciado por su gran potencial de uso en la agricultura (Lisón et al., 2019). Sin embargo, el papel de los terpenoides en la respuesta defensiva de las plantas de tomate frente a la bacteria aún no ha sido explorado.

En una primera aproximación para estudiar el papel defensivo de los terpenoides se comprobó que tenían una actividad antimicrobiana directa sobre el patógeno. Asimismo, se estudió su posible función defensiva indirecta, observando que tratamientos exógenos con  $\alpha$ -terpineol producían el cierre estomático, activaban la respuesta defensiva aumentando la expresión de *PR1*, reducían los niveles de etileno y producían un aumento de la resistencia a *Pst* en plantas de tomate (Kabbas, 2015).

Por otra parte, desde una aproximación genética, se emplearon plantas *35S:MTSI* (Van Schie et al., 2007) y *RNAi:MTSI*, generadas en nuestro laboratorio, con niveles alterados de monoterpenoides, para comprobar si presentaban un aumento en la resistencia o susceptibilidad de las plantas de tomate (Miguillón, 2018; Torres, 2018). Sorprendentemente, las plantas sobre-misoras de monoterpenoides, como el  $\alpha$ -terpineol, no resultaron ser más resistentes y se relacionó con un menor nivel de MeSA. Dichos resultados sugerían una posible relación entre la respuesta defensiva mediada por monoterpenoides y la mediada por SA.

## OBJETIVOS

En este contexto, el objetivo general de este trabajo es el estudio del modo de acción de los monoterpenoides y su relación con la respuesta defensiva mediada por SA en la interacción tomate-bacteria. Se pretende demostrar el papel de estos compuestos volátiles en la señalización defensiva de la propia planta.

Para conseguir dicho objetivo general, a continuación, se detallan los objetivos específicos:

1. Estudio de la implicación del SA en el cierre estomático y la resistencia frente a *Pst* mediada por  $\alpha$ -terpineol en plantas de tomate.
2. Estudio de la relación entre la respuesta defensiva mediada por  $\alpha$ -terpineol y la mediada por SA mediante la caracterización de plantas transgénicas que sobre-expresan o silencian la monoterpeno sintasa *MTS1*.
3. Estudio del papel de la ruta MEP en la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a *Pst* mediante tratamientos con su inhibidor fosmidomicina.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. MATERIAL VEGETAL Y MICROBIOLÓGICO

Para la realización del presente trabajo de fin de máster se emplearon plantas de tomate de la variedad MoneyMaker (MM) como control y plantas modificadas genéticamente en el mismo fondo. Por un lado, se emplearon plantas transgénicas *NahG* que expresan una SA hidroxilasa procedente de *Pseudomonas putida* que metaboliza el SA en catecol (Brading et al., 2000). Asimismo, se han utilizado plantas que sobreexpresan un gen encargado de la síntesis de monoterpenos *MTS1* (MonoTherpene Synthase 1; LeMTS1), amablemente cedidas por el Dr. Chris C. N. van Schie del Swammerdam Institute for Life Sciences de la Universidad de Amsterdam (Van Schie et al., 2007) junto con su parental con la construcción vacía (pGreen) y plantas previamente generadas en nuestro laboratorio con dicho gen silenciado *RNAi\_MTS1* en el fondo genético 'Rio Grande'.

Como bacteria patógena modelo, utilizada para el estudio del comportamiento de las plantas mencionadas anteriormente tanto transgénicas como tras los tratamientos con monoterpenoides, se empleó la cepa DC3000 de *Pseudomonas syringae* pv. tomato (*Pst*), almacenada en glicerol a -80 °C.

### 1.1 Germinación de semillas

Para la germinación de las semillas de tomate, se llevó a cabo su esterilización en agua con lejía (1:1) durante 30 min y se eliminó completamente la lejía mediante una serie de lavados (15 min, 10 min y 5 min) con agua destilada y estéril. Una vez esterilizadas, se depositaron en placas Petri de 14 cm con papel y 14 ml de agua destilada y estéril, que permite mantener las condiciones de humedad necesarias, y se mantuvieron en oscuridad a 24 °C durante 3 días en la cámara de cultivo *in vitro*. Cuando la mayoría de las semillas estaban germinadas, se destaparon las placas y se mantuvieron otros 3 días en la cámara de cultivo antes de llevar a tierra.

### 1.2 Condiciones de cultivo de las plantas en invernadero

Una vez esterilizadas y germinadas, las plántulas se llevaron a tierra para que adquiriesen el tamaño adecuado antes de la realización de la recogida de muestra. Para ello cada semilla se introdujo en macetas de 12 cm que contenían una mezcla de turba y vermiculita (1:1). Las condiciones en el invernadero que optimizan el crecimiento de las plantas de tomate son las siguientes: temperatura entre los 20-26 °C, humedad relativa entre el 50 y el 70% y con un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). Además, se empleó solución nutritiva Hoagland para su riego.

## 2. TRATAMIENTOS CON MONOTERPENOIDES Y FOSMIDOMICINA

Los tratamientos exógenos se realizaron en cajas de metacrilato. Para ello, se introdujeron 5 plantas de tomate de 26 días dentro de las cajas y se calculó la cantidad de  $\alpha$ -terpineol necesario para que en el volumen total de la caja (120 L) hubiera una concentración 5  $\mu$ M. Para distribuir de forma homogénea el  $\alpha$ -terpineol dentro de la caja se emplearon algodones hidrofílicos. Como tratamiento control se usó el agua.

Los tratamientos con fosmidomicina se realizaron por pulverización de 6 plantas de tomate MM con una solución de fosmidomicina 50  $\mu$ M y 0,05% de Tween20 que facilita la entrada de los compuestos en el tejido vegetal. Como tratamiento control se usó el agua.

## 3. RECOGIDA DE MUESTRA

Los folíolos empleados para los análisis de compuestos fenólicos (HPLC), de RNA (RT-qPCR) y de crecimiento bacteriano (unidades formadoras de colonia) fueron los de la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> hoja de cada planta. Para las medidas de ET se emplearon los folíolos de las hojas más jóvenes (5<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup> hojas). Por último, para la medida de apertura estomática se emplearon folíolos de hojas distribuidas a lo largo de toda la planta de tomate. Una vez recogidos los folíolos para HPLC y RT-qPCR, se introdujeron en botes de plástico y se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar su degradación metabólica. Las muestras se almacenan en un congelador a -80 °C hasta su posterior análisis.

## 4. INFECCIONES CON *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

### 4.1 Preparación del inóculo

El crecimiento de *Pst* se llevó a cabo en placas Petri de 90 mm de diámetro con 25 mL de medio LB agar (Tabla 1) con rifampicina (10 mg/ml) y kanamicina (100 mg/ml) y se incubó 48 h a 28 °C. A partir de la placa de LB agar, se seleccionó una colonia y se sembró en 3 mL de medio King B líquido (Tabla 2) con rifampicina (10 mg/ml) en tubos Falcon de 50 mL y se mantuvo a 28 °C y en agitación 200 rpm durante 24 h. Transcurrido el tiempo y observada la turbidez del medio por el crecimiento de *Pst*, se pasó 1 mL a 12 nuevos tubos Falcon con 14 ml de King B líquido con la finalidad de mejorar el crecimiento de la bacteria y se mantuvo 24 h a 28 °C en agitación.

**Tabla 1:** Medio de cultivo LB agar

COMPUESTO	CANTIDAD (1 L)
LB agar (Pronadisa)	35 g
Agua destilada	1 L
Rifampicina (10 mg/ml)	10 mL
Kanamicina (100 mg/ml)	0,5 mL

**Tabla 2: Medio de cultivo King B líquido**

COMPUESTO	CANTIDAD (1 L)
Proteosa peptona	10 g
Glicerol	15 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
Agua destilada	1 L
MgSO <sub>4</sub>	5 mL
Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL

Una vez obtenido el cultivo bacteriano, se preparó la solución necesaria para la infección centrifugándolo durante 15 min a 3000 rpm y resuspendiendo el sedimento en 20 mL de MgCl<sub>2</sub> 10 mM estéril. Antes de realizar la infección se ajustó la concentración de bacterias. Para ello, se midió la absorbancia a 600 nm del cultivo bacteriano con un espectrofotómetro y se obtuvo una solución de MgCl<sub>2</sub> con una D.O. de 0,1.

#### 4.2 Infección

Se seleccionó la inmersión como método de infección por ser la forma más rápida, sencilla metodológicamente y que imita mejor el proceso de infección natural de *Pst*. Para ello se emplearon 2 L de MgCl<sub>2</sub> con una D.O. 0,1 (concentración de  $5 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (CFU)/mL) de bacteria con un 0,05 % de Silwet L-77. Se sumergieron las pantas de 21-28 días durante 30 s. A su vez, como control (mock), se emplearon plantas sumergidas en una solución idéntica a la anterior sin bacterias, es decir, 2 L de MgCl<sub>2</sub> estéril con un 0,05 % de Silwet L-77.

#### 4.3 Conteo bacteriano

Transcurridas 24 h tras la infección, se procedió a la recogida de muestras y conteo bacteriano. Para ello se emplearon sacabocados que extraen 1 cm<sup>2</sup> del foliolo más externo y se introdujeron los 3 discos o en eppendorfs con 300 µL de MgCl<sub>2</sub> estéril 10 mM. Una vez reposados durante 30 min los discos se introdujeron, en cada uno de los eppendorfs, 10 bolas de vidrio y se trituraron con el homogeneizador TissueLyser II (Qiagen).

Una vez obtenido el tejido homogeneizado en los 300 µL de MgCl<sub>2</sub>, se diluyeron hasta 1 mL, añadiendo 700 µL de MgCl<sub>2</sub> 10 mM en la cabina de flujo laminar y se mezcló con ayuda de un vortex.

A continuación, empleando placas Elisa de 96 pocillos se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta llegar a la dilución deseada, en este caso 10<sup>-6</sup>.

Por último, se sembraron 4 diluciones por cada planta 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> en placas Petri de 9 cm de diámetro con 25 mL de King B agar (Tabla 3) con 100 µL de las cuatro diluciones mencionadas y se extendieron con perlas de vidrio. Las placas se mantuvieron a 28 °C durante 48 h. Posteriormente, se seleccionó la dilución que tuviera entre 30-300 colonias y se realizó el conteo con la ayuda de una lupa incorporada a un contador de colonias (Selecta; Vidrafoc).

Con el número de colonias se calculó el número de CFU/cm<sup>2</sup> y el logaritmo en base 10 de dichas CFU.

**Tabla 3: Medio de cultivo King B Agar**

COMPUESTO	CANTIDAD (1 L)
King B agar (King B Medium Pseudomonas F USP) (Pronadisa)	37 g
Glicerol	15 g
Agua destilada	1L
Rifampicina (10 mg/ml)	5 mL

$$\log \frac{cfu}{cm^2} = \frac{\text{número de colonias} \times 10 \times 10^{\text{dilución}}}{3 (\text{número de discos})}$$

## 5. ESTUDIO DE LA APERTURA ESTOMÁTICA

Se recogieron moldes de la parte abaxial de los folíolos de la siguiente manera: se añadió pegamento al envés de diferentes folíolos distribuidos a lo largo de la planta, se dejó actuar durante 5 min, se recogió el molde dejado por los folíolos con celo y se depositó en un cubre.

Una vez obtenidas las muestras, con ayuda de un microscopio Leica DC5000 (Leica Microsystems S.L.U) se colocaron los cubres en un portaobjetos y se observaron las muestras incoloras gracias a la técnica de microscopía de campo claro. A continuación, se tomaron fotos de los estomas de forma ordenada.

Las fotos se analizaron con el programa ImageJ, con el cual se midió la elipse formada por el estoma abierto o cerrado y el programa devolvió el ángulo mayor y menor, con los que se obtuvo el ratio de menor/mayor que corresponde con el ratio de apertura. Para obtener datos significativos se analizaron 50 estomas por cada genotipo y condición de 3 plantas independientes.

## 6. MEDIDA DE LA EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS POR RT-qPCR

### 6.1 Extracción RNA

Se partió del tejido congelado y homogenizado a -80 °C. Para la extracción de RNA de hojas de tomate se empleó Trizol (Trizol® Reagent; Ambion® Life Technologies) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Este proceso se realiza siempre en frío para evitar la degradación del RNA.

### 6.2 Precipitación RNA

El siguiente paso consiste en la separación en dos fases del RNA y DNA empleando LiCl. Primero se diluyó, la muestra de 35 µL con el RNA extraído, hasta alcanzar los 200 µL,

y a continuación se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de LiCl 6 M y se dejó a 4 °C durante 3h. Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 rpm a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, se añadieron otros 200  $\mu\text{L}$  de LiCl 3 M como solución de lavado del pellet. Se realizó una centrifugación más y se eliminó completamente el sobrenadante. Las muestras se almacenaron a -20 °C en 46  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato).

### 6.3 Tratamiento con DNAasa

Una vez separado el DNA y el RNA se realizó un tratamiento con DNAasa para eliminar completamente el DNA genómico que pudiera prevalecer en la muestra. Para ello, se empleó un kit comercial TURBO DNasa (Ambion® Life Technologies). A los 46  $\mu\text{L}$  anteriores se le añadieron 6  $\mu\text{L}$  de un mix formado por 5  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción (10x TURBO DNasa Buffer) y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima TURBO DNase (2 U/ $\mu\text{L}$ ).

Posteriormente, se dejó actuar la DNAasa incubando las muestras durante 30 minutos a 37 °C. Por último, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de inactivador de DNasa (DNase Inactivation Reagent) y se incubó la mezcla 2 minutos a temperatura ambiente para detener la reacción. Para finalizar, se llevó a cabo una centrifugación (10.000 rpm durante 2 min) para eliminar todos los reactivos del kit y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo.

### 6.4 Cuantificación RNA

Se recogieron los datos de la concentración de cada una de las muestras empleando un espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop® ND-1000 a 260 nm. Además, en la misma medida se comprobó la calidad de la muestra empleando dos ratios de absorbancia a diferentes longitudes de onda A260/280 (pureza del ácido nucleico, RNA frente a DNA) y A260/230 (presencia de polisacáridos). Valores entre 1,7-2 se consideraron buena calidad.

### 6.5 Retrotranscripción

Se empleó el kit comercial PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) de Takara para obtener el cDNA, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El volumen final de reacción fue de 10  $\mu\text{L}$ , y contenía 1  $\mu\text{g}$  de RNA, 2  $\mu\text{L}$  de tampón (5x PrimeScript Buffer), 0,5  $\mu\text{L}$  de oligoDT Primer 50  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  de enzima retrotranscriptasa (PrimeScript RT enzymeMix I) y H<sub>2</sub>O DEPC hasta llegar a 10  $\mu\text{L}$  (dependiendo de la concentración de RNA). Se incubaron las muestras a 37 °C durante 15 minutos y posteriormente, 15 s a 85 °C para la inactivación de la enzima.

Por último, se diluyeron las muestras con H<sub>2</sub>O DEPC hasta llegar a un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ . Las muestras se mantuvieron almacenadas a -20 °C hasta realizar las qPCR.

### 6.6 Amplificación cuantitativa de cDNA

Una vez obtenido el cDNA, se realizó la amplificación cuantitativa de cada una de las muestras. Para la realización de esta técnica se empleó el reactivo de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), cumpliendo las proporciones de SYBR, agua Mili-Q, cDNA y primers (Tabla 1s) indicadas por el fabricante.

Se emplearon placas de 96 pocillos MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate (Applied Biosystems) a las que se añadió un volumen final de reacción de 10  $\mu$ L a cada pocillo. En estos ensayos es siempre necesario tener un gen como control interno. En todas las qPCR realizadas, se utilizó la actina 4. Se realizaron 3 repeticiones técnicas de cada réplica biológica de cDNA. Se selló la placa y se dio un spin antes de introducirla en el equipo de PCR.

## 7. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Se prepararon Eppendorfs de 2 mL con 500 mg de tejido foliar almacenado a -80 °C. Se homogenizaron en 1,5 mL de metanol con ácido orto-nísico (OA), como patrón interno, a una concentración de 0,025 mM y se sonicaron durante 10 min para que el tejido quedase completamente disgregado.

Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm durante 15 minutos y a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un vial de vidrio de 4 mL. El sedimento restante se resuspendió en 500  $\mu$ L de metanol + 0,025 mM de OA y se realizó una segunda centrifugación con la finalidad de extraer la mayor parte de tejido foliar. El sobrenadante se mezcló con el anterior y se separaron en dos nuevos viales: uno para la extracción de compuestos fenólicos libres y otro para totales. Por último, los viales se secaron con una corriente de N<sub>2</sub> seco a 37 °C hasta la evaporación completa del metanol.

Para medir el contenido de compuestos totales, fenólicos libres y glicosilados, se empleó la enzima  $\beta$ -glucosidasa. Dicha enzima provoca la hidrólisis del enlace entre el fenol y el azúcar, recuperando así el compuesto fenólico total en la fase orgánica. Así pues, se resuspendieron las muestras secas totales en 900  $\mu$ L de acetato de sodio 0,1 M a pH 4.5 y se añadió 100  $\mu$ L de  $\beta$ -glucosidasa (Fluka) preparada a una concentración de 10 mg/mL en acetato de sodio 0,1 M a pH 4,5 y se dejaron en incubación a 37 °C durante toda la noche.

Para medir el contenido de compuestos fenólicos libres, las muestras se resuspendieron únicamente en 1 mL de acetato de sodio (0,1 M a pH 4.5) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron a todas las muestras 77  $\mu$ L de ácido perclórico al 70% para detener la reacción enzimática y se procedió a la extracción de los compuestos fenólicos mediante una extracción líquido-líquido con 2,5 mL de ciclopentano acetato de etilo (1:1) y la fase orgánica se transfirió a nuevos viales y se secó bajo una corriente de N<sub>2</sub> a 37 °C. Por último, se resuspendieron en 300  $\mu$ L de metanol y se filtraron con ayuda de una jeringa de 1 mL con filtro milipore de nylon de 13 mm de diámetro y 0,45  $\mu$ m de poro (Waters).

Para medir los compuestos fenólicos mediante HPLC se empleó el protocolo descrito por Bellés et al., (1999). Se transfirieron 100  $\mu$ L del extracto a viales específicos para analizar por HPLC (Accuform PP vial 0,7 mL, Thermo Scientific), y se inyectaron 30  $\mu$ L en una columna de fase reversa Sunfire C18 (5  $\mu$ m, 4,6  $\times$  150 mm; Waters, Mildford, MA)

equilibrada con ácido acético al 1% (J. T. Baker). Se aplicó un gradiente de metanol (0 a 100% en agua) durante 20 minutos, con un flujo constante de 1 mL/min. Tanto SA, GA y OA se detectaron con un detector de fluorescencia Waters 2475, empleando una  $\lambda$  de excitación de 313 nm y una  $\lambda$  de emisión de 405 nm.

Para la correcta cuantificación de SA, OA y el GA se elaboraron curvas patrón con distintas muestras de concentración conocida.

## 8. MEDIDA DE LOS NIVELES DE ETILENO

Las análisis de la medida de etileno se realizaron en el Servicio de Metabolómica del IBMCP (UPV-CSIC). Para ello, se midió el etileno acumulado durante 4 horas en viales de cierre hermético de 10 mL con 0,5 g de tejido de hoja de tomate fresco. Se analizaron 6 réplicas por muestra. La medida se realizó empleando el detector ETD-300 (Sensor Sense, Nijmegen, The Netherlands), basado en espectroscopia fotoacústica láser. Su límite de detección es de 300 partes por trillón (ppt) en medida en tiempo real con un intervalo de medida de 5 segundos.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron dos tipos de análisis. Para comparar dos o más grupos de muestras se llevó a cabo una prueba *t* de Student o un análisis de la varianza (ANOVA), respectivamente utilizando las herramientas estadísticas incluidas en el programa GraphPad. En ambos tipos de análisis un *p*-value < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

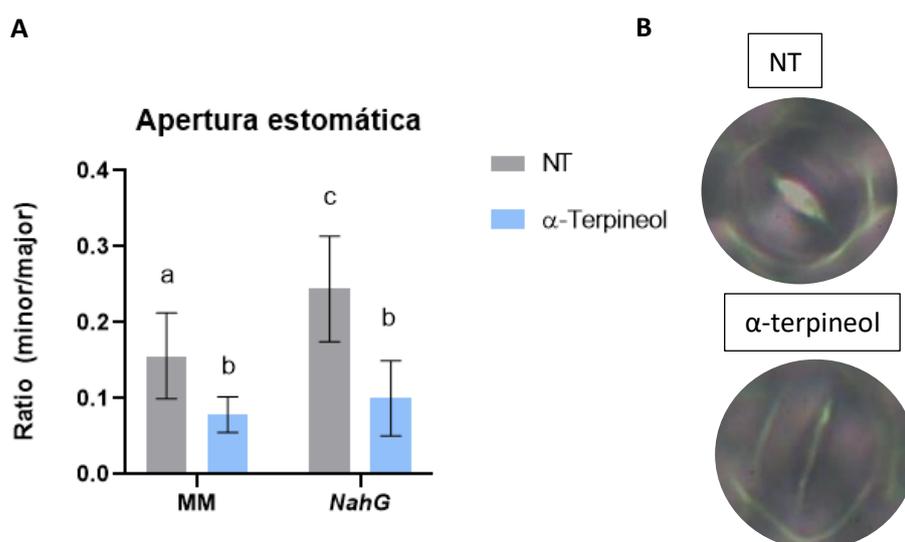
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. PAPEL DEL SA EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE $\alpha$ -TERPINEOL

#### 1.1 Papel del SA en el cierre estomático mediado por $\alpha$ -terpineol

El primer paso para elucidar el mecanismo de acción defensiva de un compuesto consiste en corroborar si confiere resistencia y cómo la confiere. En ensayos anteriores realizados en nuestro laboratorio, se comprobó que el  $\alpha$ -terpineol presenta actividad antibacteriana frente *Pst* y que tratamientos exógenos con este monoterpenoide hidroxilado, producen el cierre estomático y activan la respuesta defensiva aumentando la expresión de *PR1* y la resistencia a *Pst* en plantas de tomate (Kabbas et al., 2015).

Con el fin de descifrar el modo de acción de este compuesto, se estudió si el  $\alpha$ -terpineol afecta a la apertura estomática en plantas de tomate transgénicas *NahG* incapaces de acumular SA (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994; Figura 5).



**Figura 5. Efecto del tratamiento con  $\alpha$ -terpineol en el cierre estomático en plantas transgénicas de tomate *NahG* y su parental *MM*.** (A) Ratio de apertura estomática de plantas no tratadas (NT) y tratadas con  $\alpha$ -terpineol. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 50 estomas de 5 plantas independientes de un experimento representativo. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa de las plantas tratadas con  $\alpha$ -terpineol respecto a las plantas control y entre genotipos, con un  $p$ -value  $< 0.05$ . (B) Imágenes 40x de un estoma representativo abierto en hojas no tratadas (NT) y cerrado tras el tratamiento ( $\alpha$ -terpineol).

Como se puede observar en la Figura 5, la apertura estomática es menor tanto en las plantas silvestres como en las transgénicas después de aplicar una concentración 5  $\mu$ M de  $\alpha$ -terpineol en cajas de metacrilato durante 24 h. Este cierre estomático podría suponer una mayor resistencia de las plantas tratadas con  $\alpha$ -terpineol. Es importante destacar que el cierre estomático provocado por el tratamiento en las plantas *NahG* indica que dicho proceso es independiente de la activación de la ruta defensiva del SA. Es decir, el  $\alpha$ -terpineol cierra los estomas de forma independiente al SA. Este cierre estomático se puede

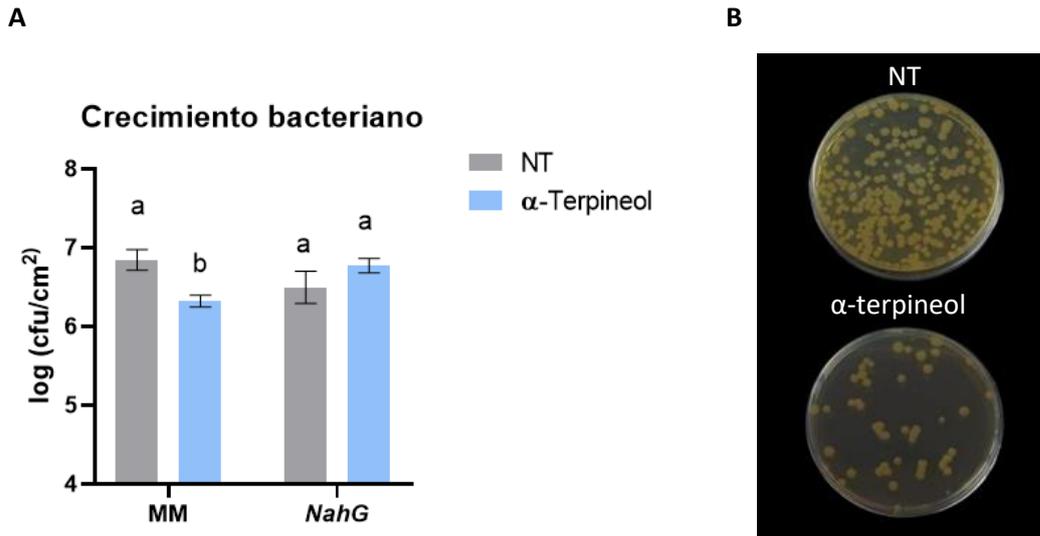
comparar con el modo de acción de otros compuestos volátiles, como es el caso del butanoato de hexenilo (HB) que también provoca el cierre estomático de manera independiente de SA (López-Gresa et al, 2018).

Se ha comprobado que el SA y el ABA son los principales inductores del cierre estomático cuando se acumulan en una situación de estrés biótico y abiótico, respectivamente (Prodhan et al., 2018). El mecanismo de cierre no está esclarecido, pero se ha demostrado que el SA induce genes de biosíntesis de ET, ROS, óxido nítrico (NO) y produce el cierre estomático en *A. thaliana* (Wang et al., 2020). En este caso, cabe destacar que el  $\alpha$ -terpineol en un estado basal de no infección provoca el cierre estomático tanto en plantas silvestres como en plantas con niveles mínimos de SA (*NahG*), por lo que, el  $\alpha$ -terpineol provoca el cierre de forma independiente al SA.

### 1.2 Papel del SA en la resistencia a bacteria mediada por $\alpha$ -terpineol

Para comprobar si el tratamiento exógeno de  $\alpha$ -terpineol aumenta la resistencia en plantas de tomate de una manera independiente de SA, se llevó a cabo el conteo bacteriano en hoja 24 horas después de su aplicación en plantas de tomate MM y en plantas transgénicas *NahG* infectadas por *Pst* (24 hpi). La infección se llevó a cabo por inmersión que es el método que mejor reproduce la infección natural y permite la entrada del patógeno por los estomas. De esta forma se podría concluir que el cierre estomático inducido por  $\alpha$ -terpineol es suficiente para aumentar la resistencia de las plantas.

Tal y como se observa en la Figura 6 las plantas MM tratadas con  $\alpha$ -terpineol aumentan significativamente su resistencia frente a *Pst*, confirmando resultados previos del grupo (Kabbas et al., 2015), mientras que esta resistencia no se aprecia en las plantas *NahG*. Este resultado, contrasta con el cierre estomático observado tanto en las plantas MM como *NahG* tras el tratamiento con  $\alpha$ -terpineol (Figura 5). Es evidente que este cierre estomático analizado en las plantas *NahG* no es suficiente para inducir la resistencia. Este hecho lleva a pensar que el  $\alpha$ -terpineol actúa de forma conjunta al SA en las plantas MM haciéndolas más resistentes, no siendo dicho cierre estomático un mecanismo suficiente por sí mismo. Este mismo resultado también indica que el efecto antibiótico del  $\alpha$ -terpineol (Kabbas, 2015) no es suficiente para generar resistencia en planta ya que también debería haberse observado en las plantas transgénicas *NahG*.



**Figura 6. Efecto del tratamiento con  $\alpha$ -terpineol en el crecimiento bacteriano en plantas de tomate transgénicas NahG y su parental MM.** (A) Crecimiento de *Pst* en hojas de tomate no tratadas (NT) y tratadas con  $\alpha$ -terpineol. Las muestras fueron tomadas 24 h después de la infección para realizar el conteo bacteriano. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 6 plantas independientes de un experimento representativo. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa de las plantas pre-tratadas con  $\alpha$ -terpineol respecto a las plantas no tratadas y entre genotipos, con un  $p$ -value  $< 0.05$ . (B) Placas Petri representativas donde se observan el número de colonias en plantas MM no tratadas (NT) y en plantas tratadas 24 h antes de la infección ( $\alpha$ -terpineol).

En ensayos anteriores se comprobó que tratamientos con  $\alpha$ -terpineol inducen significativamente la expresión de genes implicados en la respuesta defensiva de las plantas de tomate, como *PR1* y *P23*, así como la acumulación de sus proteínas (Kabbas, 2015). Este hecho podría explicar la resistencia observada en las plantas MM frente a la susceptibilidad de las plantas *NahG* tras los tratamientos exógenos con el monoterpenoide. La activación de la transcripción de *PR1* y *P23* está estrechamente relacionada con la biosíntesis y señalización del SA. Por tanto, las plantas *NahG*, incapaces de acumular SA, no podrían inducir *PR1* y *P23* al ser tratadas con  $\alpha$ -terpineol, y este hecho podría explicar el no aumento de la resistencia observado.

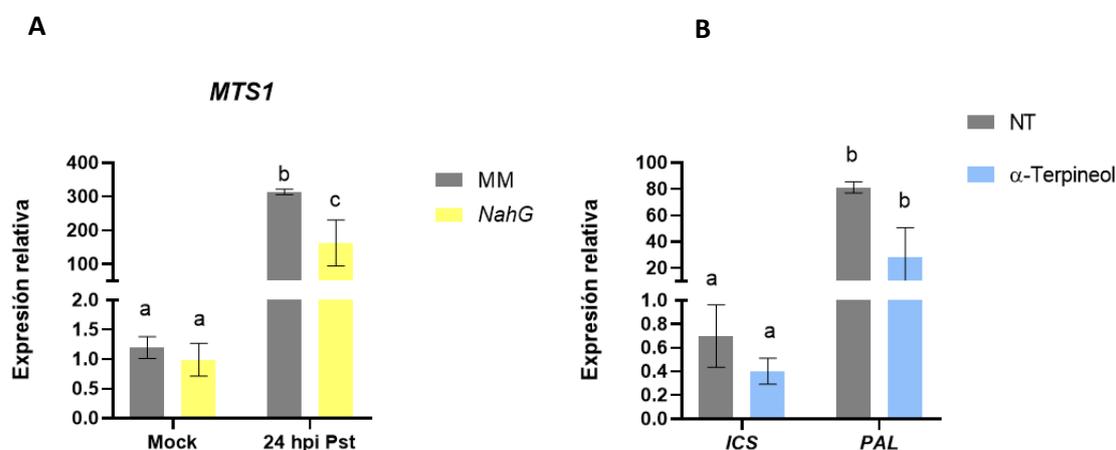
La posible relación entre los monoterpenos y el SA se ha observado también en *Arabidopsis thaliana*. Se ha descrito que tratamientos con  $\alpha$ -pineno en *A. thaliana* aumentan la resistencia frente a *Pst*. Sin embargo, tratamientos con  $\alpha$ -pineno de mutantes en el gen *EDS1*, implicado en la señalización por SA (Feys et al., 2001), no muestran esta resistencia, indicando que el gen *EDS1* y, por lo tanto, el SA, son necesarios para activar la resistencia de la planta a *Pst* mediada por este monoterpeno (Riedlmeier et al., 2017).

Por lo que nuestros resultados parecen indicar que el  $\alpha$ -terpineol podría aumentar la resistencia frente a *Pst* debido tanto a la inducción del cierre estomático como a la señalización mediada por la hormona SA.

### 1.3. Papel del SA en la inducción de la biosíntesis de $\alpha$ -terpineol tras una infección bacteriana

Para comprobar el papel del SA en la inducción de la biosíntesis de monoterpenoides en la respuesta defensiva de la planta se analizaron los niveles de expresión de la monoterpeno sintasa 1 (*MTS1*) en plantas *NahG* y MM infectadas con la bacteria *Pst* (Figura 7).

Como se muestra en la Figura 7A se produjo una activación significativa del gen *MTS1* 24 horas tras la infección con *Pst* tanto en las plantas transgénicas como en las plantas parentales, siendo los niveles de expresión tras la infección significativamente menores en las plantas *NahG*.



**Figura 7. Expresión de los genes *MTS1*, *ICS* y *PAL* en plantas de tomate transgénicas *NahG* y su parental *MM*.** (A) Expresión *MTS1* en plantas *MM* y *NahG*, mock e infectadas con *Pst* tras 24 horas post-inoculación (24 hpi *Pst*). (B) Niveles de expresión de *ICS* y *PAL* en plantas *MM* no tratadas (NT) y tratadas 24 h con  $\alpha$ -terpineol 5  $\mu$ M en cajas de metacrilato. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa de las plantas pre-tratadas con  $\alpha$ -terpineol/infectadas 24 h con *Pst* respecto a las plantas control y entre plantas transgénicas *NahG* con respecto a su parental *MM*, con un *p*-value < 0.05.

Este resultado parece indicar que la acumulación de SA o por lo menos, su biosíntesis tras la infección con *Pst*, activa en mayor medida la ruta de monoterpenoides, indicando que el SA es parcialmente necesario para su inducción. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que las plantas *NahG* sintetizan el SA, pero posteriormente se degrada, por lo que, los niveles de SA no son nulos y aumentan con la infección, pudiendo los niveles transitorios de SA ser los responsables de la activación observada de *MTS1* en las plantas *NahG*. Este resultado concuerda con otras evidencias que indican que la biosíntesis de terpenos y consecuentemente de terpenoides, mejora con la activación de la respuesta defensiva mediada por SA (Gil et al., 2005). El SA es un potente señalizador de la respuesta defensiva capaz de interactuar con otras rutas como las del ET, ROS y NO (Lieberherr et al., 2003). Este resultado sugiere que, el SA, podría comportarse como un señalizador de la activación de la ruta del metileritritol fosfato (MEP; Figura 4). Experimentos futuros con mutantes de SA podrían ayudar a confirmar esta hipótesis.

Por otra parte, se decidió comprobar si el tratamiento con  $\alpha$ -terpineol afecta a la biosíntesis del SA. Para ello, se midieron los niveles de expresión relativos de los dos genes implicadas en su biosíntesis: *ICS* y *PAL*, tras tratamientos con  $\alpha$ -terpineol. En la Figura 7B se muestra que los niveles de expresión de ambos genes tienden a disminuir tras 24h del tratamiento con  $\alpha$ -terpineol, aunque este descenso no es estadísticamente significativo. Este resultado indica que los tratamientos con  $\alpha$ -terpineol no disminuyen la biosíntesis de la hormona por excelencia de la resistencia frente a patógeno biotrofos, manteniéndose así la respuesta defensiva mediada por SA.

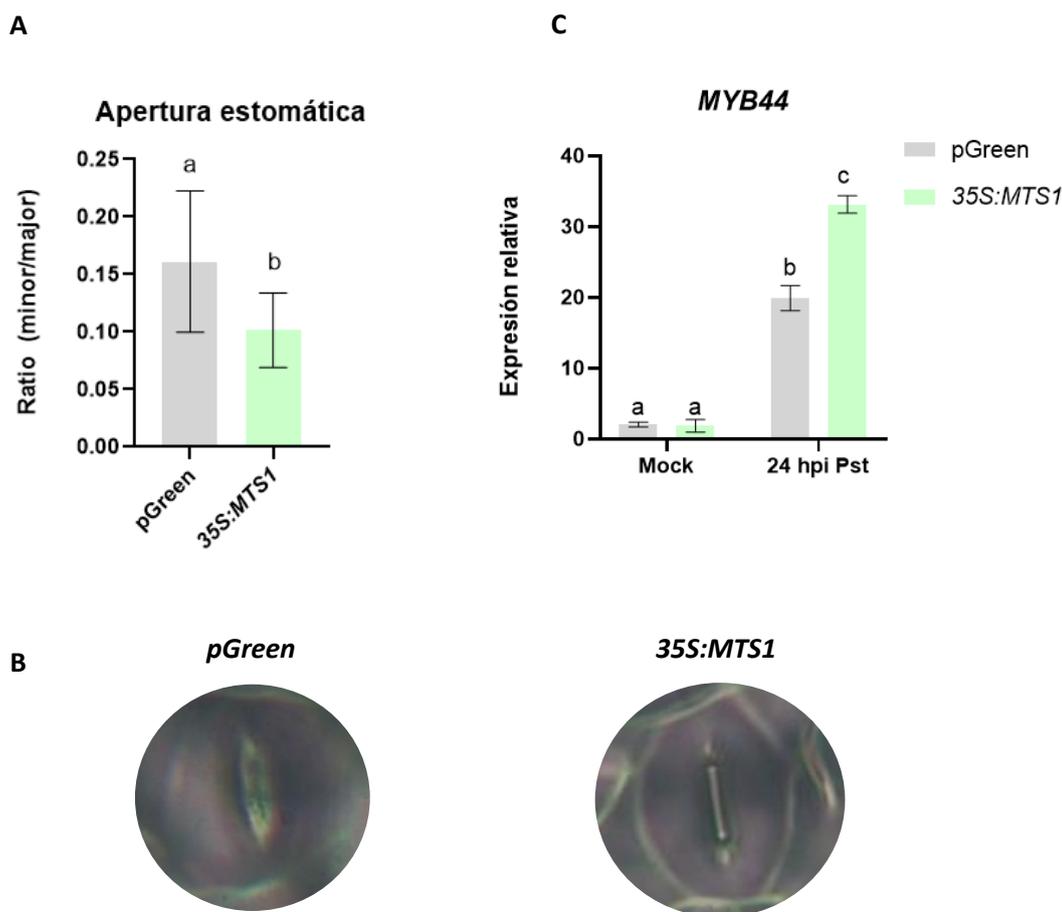
Nuestros resultados contrastan con los obtenidos en *Arabidopsis thaliana*, donde se ha descrito que tratamientos exógenos con monoterpenos como el  $\alpha$ -pineno aumentan la expresión del gen *EDSI* que es una proteína que promueve la señalización del SA (Feys et al., 2001), correlacionando dicha expresión con el aumento de la expresión del factor de transcripción CBP60g que regula la expresión del gen *ICS* y la acumulación de SA (Cui et al., 2017; Riedlmeier et al., 2017).

## 2. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DEL MODO DE ACCIÓN DEL $\alpha$ -TERPINEOL Y LA RESPUESTA DEFENSIVA MEDIADA POR SA MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS CON NIVELES ALTERADOS DE *MTS1*.

### 2.1 EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE *MTS1* EN LA RESPUESTA DEFENSIVA MEDIADA POR SA EN PLANTAS DE TOMATE

#### 2.1.1 Estudio del cierre estomático en las plantas transgénicas *35S:MTS1*

Con la finalidad de confirmar el modo de acción de los monoterpenos en la respuesta defensiva de las plantas de tomate se emplearon plantas transgénicas *35S:MTS1*, que emiten de forma constitutiva mayor cantidad de monoterpenoides como el  $\alpha$ -terpineol, geraniol, linalol etc en comparación con su fondo genético pGreen (Minguillón, 2018). La primera aproximación fue comprobar si esta mayor emisión de monoterpenoides provoca el cierre estomático.



**Figura 8. Efecto de la sobreexpresión del gen MTS1 en la apertura estomática en plantas transgénicas de tomate 35S:MTS1 (verde) y su parental pGreen (gris).** (A) Ratio de apertura estomática. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes y se midió el ratio en 50 estomas de 5 plantas independientes. (B) Imágenes 40x de un estoma representativo de plantas transgénicas (35S:MTS1) y su parental (pGreen). (C) Niveles de expresión del gen MYB44 en plantas sin infectar (Mock) e infectadas tras 24h de infección con Pst (24 hpi Pst). Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa de las plantas transgénicas y su parental y la infección frente a una situación basal, con un p-value < 0.05.

Como se observa en la Figura 8A y 8B, los estomas de las plantas transgénicas 35S:MTS1 se encuentran más cerrados que en las plantas silvestres pGreen. Este resultado concuerda con el cierre estomático observado con los tratamientos exógenos de  $\alpha$ -terpineol, reafirmando el papel de los monoterpenoides en la regulación del cierre estomático.

Con el fin de correlacionar estos datos con la señalización por ABA, se midió la expresión de MYB44, un factor de transcripción implicado en la señalización del ABA y el cierre estomático (Hieno et al., 2016), en las plantas transgénicas y sus parentales tras la infección bacteriana. Se observó una mayor expresión significativa de MYB44 en las plantas transgénicas 35S:MTS1 que en su parental (Figura 8C) infectadas, por lo que, se podría afirmar que una mayor producción de monoterpenoides podría relacionarse con un mayor cierre estomático mediado por ABA.

En el proceso de infección de *P. syringae* en tomate se han diferenciado dos etapas (Du et al., 2014). Cuando la planta de tomate reconoce la flagelina activa una cascada de señalización que desemboca en el cierre estomático tras la primera hora de infección y se traduce en una menor entrada de bacteria al apoplasto. Después de 4 h de la inoculación bacteriana, la bacteria produce la coronatina que provoca la reapertura estomática por la activación de la ruta del JA y la inhibición del SA (Figura 2). La liberación de monoterpenoides hidroxilados, tras la infección por *Pst*, podría suponer una tercera fase en la respuesta defensiva de las plantas, fruto de la evolución, en la que la planta contrarresta el papel de la coronatina para sobrevivir. El cierre estomático constituye un mecanismo defensivo, pues provoca que la bacteria se mantenga durante más tiempo en el tejido externo, un ambiente hostil para su supervivencia.

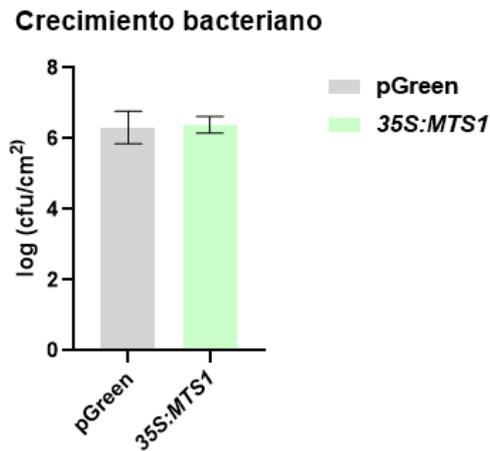
Tras el análisis de estos resultados, se podría concluir que uno de los principales mecanismos de los monoterpenoides hidroxilados es el cierre estomático, pero es necesario comprobar si este cierre es suficiente como para evitar la infección por *Pst*.

### 2.1.2 Estudio de la resistencia ante una infección bacteriana de las plantas transgénicas *35S:MTSI*

Se ha comprobado anteriormente como tratamientos exógenos con  $\alpha$ -terpineol reducen el crecimiento bacteriano en plantas silvestres MM (Figura 6), por lo que, cabría pensar que la sobreexpresión del gen *MTSI* aumentaría la resistencia a la bacteria. Con esta finalidad, se llevó a cabo una infección con *Pst* por inmersión tanto en las plantas transgénicas *35S:MTSI* como en sus parentales pGreen y transcurridas 24 h se realizó el conteo bacteriano.

Como se observa en la Figura 9, sorprendentemente la sobreexpresión de *MTSI* no produjo una mayor resistencia a *Pst* en las plantas de tomate, como cabría esperar. Este resultado no concuerda con los tratamientos exógenos realizados, ni con otros datos recogidos en la bibliografía que relacionan los monoterpenoides con una mayor resistencia frente a patógenos. Por ejemplo, se ha comprobado, en arroz, como la inducción del gen *OsTPS121* tras tratamientos con JA, provocan un aumento en los niveles de geraniol y una reducción del crecimiento de *Xanthomonas oryzae* (Kiyama et al., 2021). Además, el gen *OsTPS19* sobreexpresado en varias líneas de arroz muestra una mayor resistencia a *M. oryzae*, que se ha correlacionado con un aumento en los niveles de (*S*)-limoneno (Chen et al., 2018).

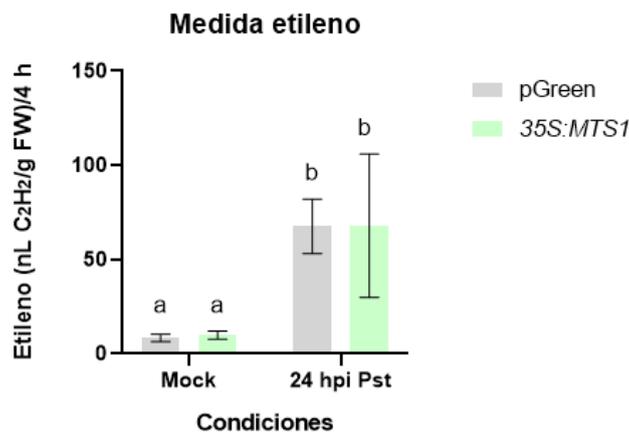
Nuestros resultados sugieren que el cierre estomático no es suficiente para producir un aumento en la resistencia de las plantas *35S:MTSI* y, por tanto, deben estar implicados otros mecanismos.



**Figura 9.** Crecimiento de *Pst* en plantas transgénicas de tomate 35S:MTS1 (verde) y su parental pGreen (gris) e infectadas tras 24 h de la inoculación con *Pst*. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 6 plantas independientes de un experimento representativo. Los asteriscos indican que existe una diferencia significativa de las plantas transgénicas y su parental, con un  $p$ -value  $< 0.05$  y su ausencia que no hay diferencia.

### 2.1.3 Estudio de los niveles de etileno en las plantas transgénicas 35S:MTS1

Se observó que tratamientos con  $\alpha$ -terpineol producen una disminución en los niveles de ET tras la infección bacteriana (Figura 1S; anexo), correlacionando con el cierre estomático, ya que, en presencia de ABA, se ha descrito que el ET inhibe el cierre estomático en *A. thaliana* (Tanaka, 2005). Para confirmar la posible disminución de ET causada por la sobreexpresión de *MTS1*, se llevaron a cabo medidas de los niveles de ET en las plantas control y transgénicas antes y después de la infección con la bacteria *Pst*.



**Figura 10.** Niveles de ET en hojas de plantas transgénicas de tomate 35S:MTS1 (verde) y su parental pGreen (gris) sin infectar (Mock) e infectadas tras 24h después de la inoculación con *Pst* (24 hpi Pst). Los niveles de ET fueron determinados a las 24 h días post-inoculación (dpi). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 6 plantas independientes de un experimento representativo. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa de las plantas transgénicas y su parental y la infección y la situación basal, con un  $p$ -value  $< 0.05$ .

La Figura 10 muestra que los niveles de etileno aumentan tras la infección con *Pst* del mismo modo en las plantas transgénicas que en su fondo genético, no observándose tampoco diferencias significativas en los niveles de ET en las plantas *35S:MTSI* antes de someterlas a la infección.

El ET se ha relacionado con un aumento de la resistencia frente a infecciones bacterianas, puesto que activa la expresión de genes de defensa (Cellini et al., 2021; Yang et al., 2020). Nuestros resultados parecen indicar que la sobre-emisión de monoterpenoides no produce diferencias significativas en los niveles de ET, lo que concuerda con la ausencia de resistencia observada en las plantas transgénicas infectadas (Figura 9).

#### 2.1.4 Estudio de los niveles de expresión de genes implicados en el metabolismo y la señalización del SA en las plantas transgénicas *35S:MTSI*

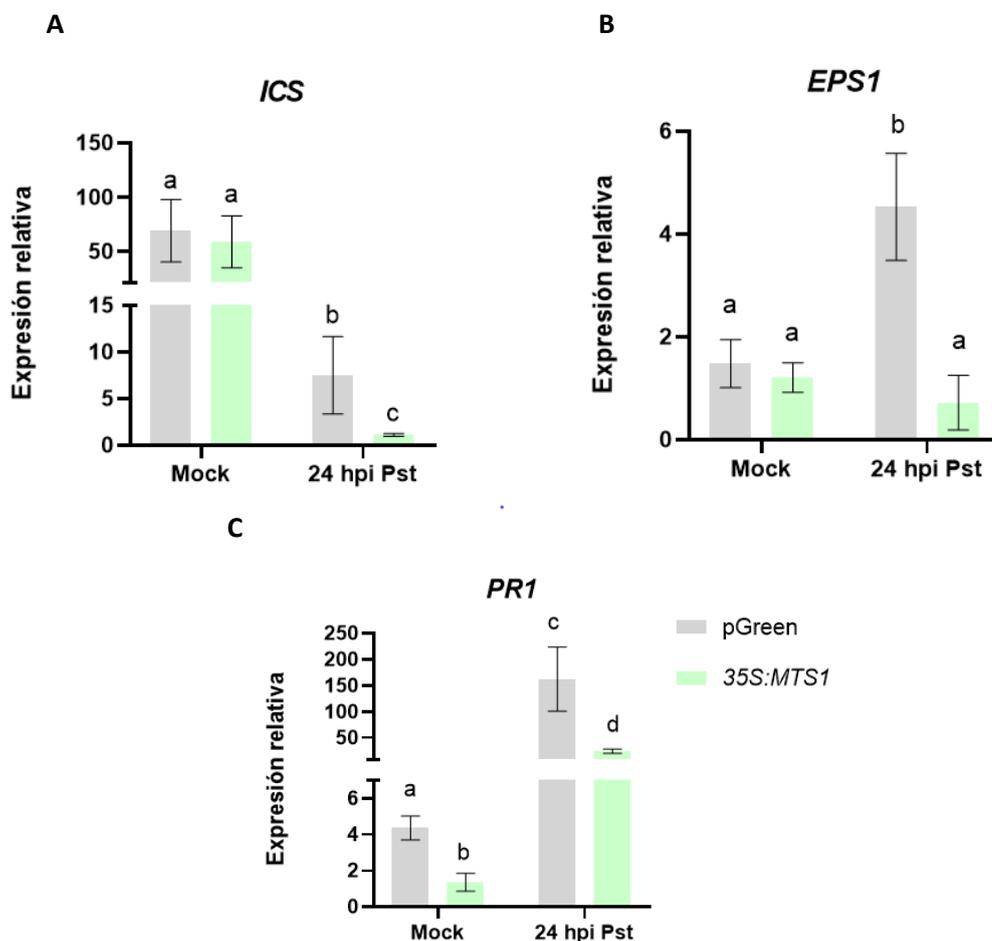
Previamente en nuestro laboratorio se realizó un análisis metabolómico por GS-MS de las plantas *35S:MTSI* y su parental pGreen infectadas con *Pst*, con el fin de identificar compuestos diferenciales implicados en la respuesta defensiva (Minguillón, 2018). A parte de la sobre-emisión de monoterpenoides en las plantas transgénicas, se observó una menor cantidad del volátil metil salicilato (MeSA) tras la infección, en comparación con su parental pGreen. El MeSA es una molécula señal implicada en la activación de la respuesta SAR (Bartsch et al., 2010). La menor acumulación de este compuesto en las plantas transgénicas tras la infección con *Pst*, podría indicar que la respuesta SAR es menor en estas plantas.

A partir de este resultado, se planteó la posible existencia de un *cross-talk* negativo entre la biosíntesis de monoterpenoides y la respuesta mediada por SA, lo que explicaría el hecho de que las plantas transgénicas *35S:MTSI* no fueran más resistentes a la infección.

Para comprobar la existencia de este *cross-talk*, se midieron los niveles de expresión de los genes relacionados con la biosíntesis y señalización de SA en las plantas transgénicas *35S:MTSI*, así como en sus correspondientes parentales pGreen antes y después de la infección con *Pst* (Figura 11). Con esta finalidad, se midió la expresión relativa mediante RT-qPCR de los genes *ICS* (*Isocorhismate synthase*), *EPS1* (*BAHD acyltransferase*), *SAM-T* (*S-Adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase*) y *S5H* (*Salicylate 5-hydroxylase*), todos ellos implicados en el metabolismo del SA (Figura 3; Ding y Ding, 2020). Además, se midió la expresión de *PR1*, marcador de la señalización mediada por SA y de la respuesta defensiva mediada por patógenos biotrofos (Granell et al., 1987; Tornero et al., 1993).

Como se puede comprobar en la Figura 11A y B, los dos genes implicados en la biosíntesis del SA (*ICS* y *EPS1*) tienen una menor expresión en las plantas transgénicas *35S:MTSI* que en su parental 24 h después de la infección con *Pst*. Cabe remarcar que estadísticamente no hay diferencias significativas en los niveles de expresión entre pGreen y *35S:MTSI* en plantas no infectadas (mock). En cuanto a la señalización del SA

(Figura 11C), las plantas transgénicas mostraron una menor expresión relativa del gen *PR1* que sus parentales tanto infectadas como no infectadas (mock).



**Figura 11.** Niveles de expresión de los genes *ICS* (A), *EPS1* (B) y *PR1* (C) en plantas transgénicas de tomate *35S:MTS1* (verde) y su parental *pGreen* (gris), tanto en plantas sin infectar (Mock) e infectadas tras 24h después de la inoculación con *Pst* (24hpi Pst). Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa de las plantas transgénicas y su parental y la infección y la situación basal, con un  $p$ -value  $< 0.05$ .

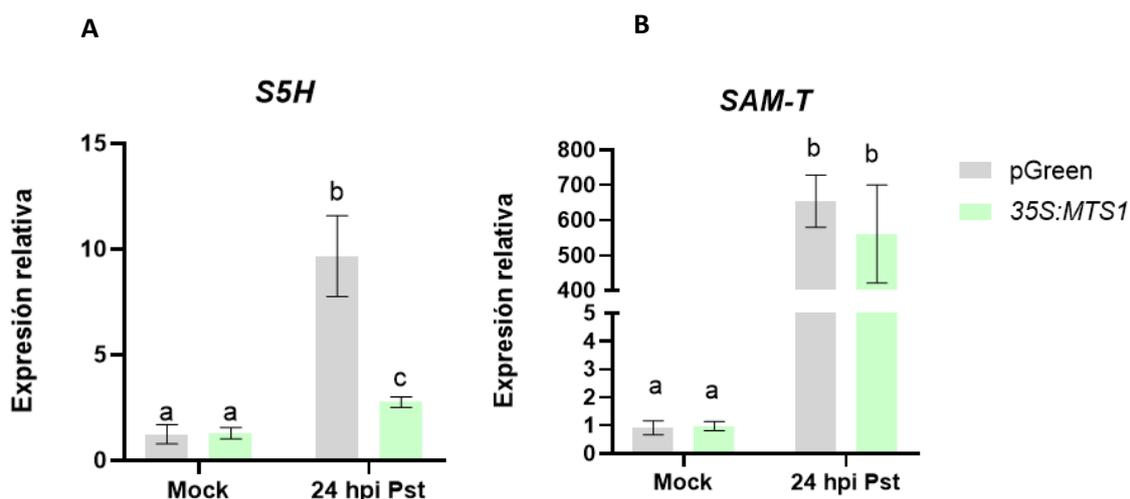
Estos resultados sugieren que la biosíntesis del SA se encuentra reprimida en condiciones de estrés en las plantas transgénicas *35S:MTS1* y, como consecuencia, también su señalización.

La infección bacteriana provoca la expresión a las 24h de los genes encargados de la biosíntesis del SA para combatir la entrada de la bacteria. Sin embargo, en una situación sin estrés, no es necesario activar la expresión de estos genes, ya que, es conveniente mantener los niveles de SA bajos por su toxicidad (Zhou et al., 2021). Además, la expresión del gen *ICS* disminuye tras 24 horas de la infección (Figura 11A). Es importante tener cuenta el ciclo infeccioso de *P. syringae* para comprender este resultado, ya que, durante las primeras horas de infección, los niveles de SA aumentan para combatir la

entrada del patógeno como consecuencia de la respuesta PTI. A las 24 h (recogida de muestra), la expresión de *ICS* decae, debido a una retroalimentación negativa por producto: los altos niveles de SA y su toxicidad provocan que el principal gen de su biosíntesis se inhiba para evitar su acumulación produciendo la necrosis del tejido (Ogawa et al., 2007). En cambio, el gen *EPSI* aumenta su expresión tras la infección en las plantas pGreen (Figura 11B). Comparando los niveles relativos de expresión se observa que el gen *ICS* está más comprometido por la infección que el gen *EPSI*, ya que, sus niveles de expresión se ven más alterados. Esto podría deberse a su papel fundamental en la respuesta defensiva y en la biosíntesis del SA. Del mismo modo, la expresión de *PRI* también aumenta de forma muy acusada tras la infección debido a la activación de la señalización y las respuestas mediadas por SA (Figura 11C).

El genotipo *35S:MTS1* sometido a la infección 24 h *Pst* mostró una menor expresión de los tres genes analizados *ICS*, *EPSI* y *PRI* en comparación con su parental pGreen, confirmando el *cross-talk* negativo ya observado entre los monoterpenoides y el SA, puesto que estas plantas transgénicas que acumulan más monoterpenoides, emiten menos MeSA (Minguillón, 2018).

Por último, también se analizó la expresión de alguno de los genes relacionados con la degradación del SA (Figura 12). El SA puede resultar tóxico si su producción y concentración se mantiene elevada en el tiempo y puede llegar a provocar la muerte celular. Por ello, su eliminación o conversión en otras moléculas no tóxicas es necesaria. El gen *SAM-T* está implicado en el metabolismo del SA, al transformarlo, mediante una metilación en el compuesto MeSA, que se trata de la principal molécula señal en la respuesta SAR (Van Gelder et al., 2020). Otro gen implicado en el catabolismo del SA es el gen *S5H* que mediante una hidroxilación del SA produce GA (Zhang et al., 2017; Thomazella et al., 2021).



**Figura 12.** Niveles de expresión de los genes *S5H* (A) y *SAM-T* (B) en plantas transgénicas de tomate *35S:MTS1* (verde) y su parental (pGreen; gris), tanto en plantas sin infectar (Mock) e infectadas tras 24h después de la inoculación con *Pst t* (24 hpi Pst). Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo. Letras diferentes indican que existe una

diferencia significativa de las plantas transgénicas y su parental y la infección y la situación basal, con un  $p$ -value  $< 0.05$ .

Como se observa en la Figura 12, la expresión de *SAM-T* y *S5H* aumenta de forma significativa tras la infección tanto en las plantas transgénicas como en su fondo genético. Estos datos concuerdan con la degradación del SA producido tras 24 h de la infección con *Pst*. Sin embargo, en las plantas *35S:MTSI* se observa una menor expresión relativa del gen *S5H* tras la infección (Figura 12A), posiblemente debido a una menor acumulación del SA en las plantas transgénicas. Por tanto, el comportamiento de los genes encargados de la degradación del SA es el mismo que el de los de biosíntesis en cuanto a la expresión diferencial entre genotipos.

A modo de resumen, hemos observado que las plantas transgénicas *35S:MTSI* infectadas con la bacteria *Pst* presentan una menor expresión de los genes de biosíntesis de SA (*ICS* y *EPSI*), lo que podría corresponder con una menor acumulación de dicho compuesto fenólico, produciendo una menor activación de la señalización (*PRI*) y de los genes implicados en su degradación (*S5H*).

Para entender estos resultados, es necesario buscar una conexión entre la ruta de los compuestos fenólicos y de los monoterpenoides (Ruta MEP) para describir el *cross-talk*. Existen varias evidencias de que estas rutas están estrechamente relacionadas. (1) Ambas tienen un precursor común, el fosfoenolpiruvato, que es necesario tanto para la vía MEP como para la del shikimato, rutas de biosíntesis de terpenoides y fenólicos, respectivamente (Kang et al., 2014). (2) Se ha demostrado que mutantes en la enzima CHI1 (Chalcona isomerasa 1) que actúa aguas abajo de la PAL (biosíntesis de SA) son deficientes tanto en fenólicos como en monoterpenoides (Sugimoto et al., 2021). (3) La reducción en la actividad de la enzima HDS (1-hidroxi-2-metil-2-butenil-4-difosfato sintasa) que interviene en la penúltima etapa de la ruta MEP convirtiendo MEcPP (2-C-metil-d-eritritol-2,4-ciclodifosfato) en HMBPP (1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato) mejora la respuesta mediada por SA, pudiéndose deber a que una acumulación de MEcPP provocaría un aumento en los niveles de SA (Gil et al., 2005). Estas evidencias conectan las rutas de biosíntesis de compuestos fenólicos y monoterpenoides, sin embargo, su conexión no está todavía esclarecida.

Por tanto, los resultados obtenidos reafirman la existencia de un *cross-talk* negativo entre los monoterpenoides y la biosíntesis de SA. Esto supone que el papel positivo en la respuesta defensiva de los monoterpenoides podría verse contrarrestado por la disminución de la respuesta SAR mediada por SA.

### 2.1.5 Estudio de los niveles de acumulación de SA y GA en las plantas transgénicas *35S:MTSI*

Para comprobar si la reducción en los niveles de expresión de los genes implicados en la biosíntesis de SA en las plantas transgénicas *35S:MTSI* se asocia con una disminución en los niveles de acumulación de dicho compuesto y derivados, se analizaron los niveles de SA y de GA mediante HPLC.

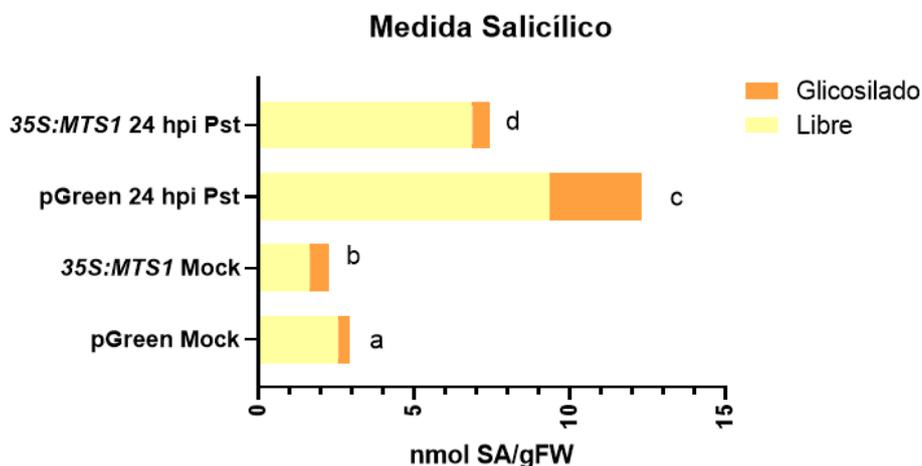
Tanto el SA como el GA se acumulan en la planta, unidos a los azúcares glucosa y xilosa, respectivamente (glicosilados), tras una infección con un patógeno biotrofo. Por tanto, se decidió analizar los niveles de SA y GA en las plantas transgénicas tanto en su forma libre como en su forma conjugada, a las 24 horas después de la infección y en la situación basal (ver Materiales y Métodos).

Como se puede comprobar en la Figura 13, los niveles de GA y SA en las plantas *35S:MTS1* resultaron ser ya menores incluso en condiciones basales sin infectar (mock) en comparación a su fondo genético pGreen. Este hecho podría explicar la menor expresión basal de *PR1* en las plantas transgénicas (Figura 11C). Asimismo, dichos niveles aumentaron de forma significativa a las 24 horas después de la infección con *Pst*, siendo de nuevo significativamente inferiores en las plantas transgénicas *35S:MTS1* y, de nuevo, correlacionando con una menor expresión de *PR1* en dichas plantas transgénicas infectadas (Figura 11C).

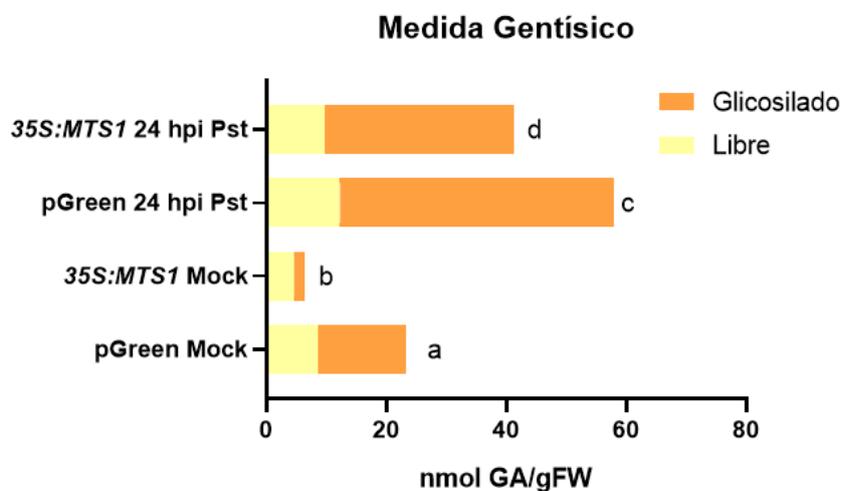
Los menores niveles de acumulación de SA y GA en las plantas transgénicas, así como los menores niveles de expresión de *PR1*, podrían explicar el hecho de que dichas plantas no sean más resistentes a pesar de producir más monoterpenos, volviendo a confirmar la existencia de un *cross-talk* negativo entre los monoterpenoides y el SA.

Por tanto, la susceptibilidad de las plantas transgénicas se puede relacionar con una disminución de los niveles de SA y GA que indican una menor activación de la respuesta defensiva de la planta y un mayor crecimiento de *Pst* en el apoplasto.

A



B



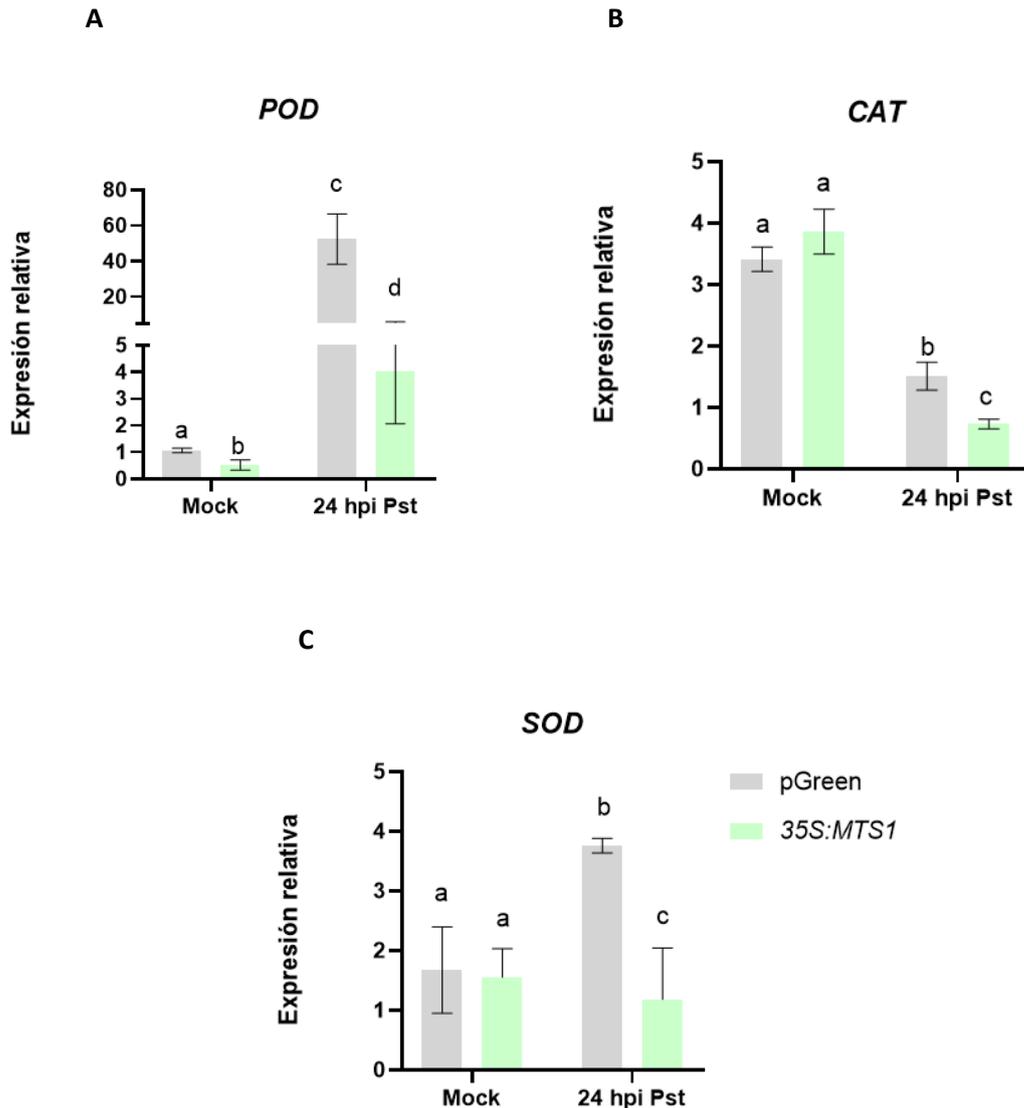
**Figura 13.** Medidas de los niveles de SA (A) y GA (B) en plantas transgénicas de tomate *35S:MTS1* y su parental *pGreen* sin infectar (*Mock*) e infectadas tras 24h después de la inoculación con *Pst* (24 hpi *Pst*). Se representan los niveles totales como libres y glicosilados. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 5 plantas independientes de un experimento representativo. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa de las plantas transgénicas y su parental y la infección y la situación basal, con un  $p$ -value  $< 0.05$ .

Como se ha comentado anteriormente, existen evidencias en la conexión entre la ruta MEP y la resistencia mediada por SA puesto que se ha comprobado que al inhibir uno de los últimos pasos de la ruta MEP, aumenta la señalización por SA. Así, mutantes *ceh1*, *knock out* de la enzima HDS, presentan una acumulación del metabolito MEcPP y esto se relaciona con una expresión 4 veces mayor del gen *ICS* en *Arabidopsis* (Gil et al., 2005). Por otra parte, se ha descrito que el MEcPP es un potente señalizador del estrés biótico por patógenos biotrofos. Tras reconocer al patógeno, estimula la vía MEP para producir monoterpenos, y además el MEcPP sale del cloroplasto hacia el núcleo donde activa la expresión de *ICS* encargado de la respuesta defensiva mediada por SA en *Arabidopsis* (Xiao et al., 2012).

Así pues, las plantas transgénicas *35S:MTS1*, que presentan una mayor emisión de monoterpenoides, podrían estar dirigiendo los precursores de la ruta del MEP hacia la biosíntesis de monoterpenoides, lo que provocaría la reducción de los intermediarios de la ruta, entre ellos el MEcPP, disminuyendo así la señalización mediada por SA. La supuesta menor acumulación de MEcPP supondría una menor activación de la síntesis del SA, confirmándose así la existencia de un *cross-talk* negativo entre los monoterpenoides y la respuesta defensiva mediada por SA.

### 2.1.6 Estudio de los niveles de estrés oxidativo en las plantas transgénicas *35S:MTS1*

Para comprobar el estado del estrés oxidativo en las plantas *35S:MTS1* y pGreen se analizaron los niveles de expresión de genes encargados de la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Se emplearon como marcadores los genes: *SOD* (superóxido dismutasa), *CAT* (catalasa) y *POD* (peroxidasa), que codifican las tres principales enzimas detoxificantes de ROS de las plantas (Figura 14).



**Figura 14.** Niveles de expresión de los genes *POD* (A), *CAT* (B) y *SOD* (C) en plantas transgénicas de tomate *35S:MTS1* (verde) y su parental pGreen (gris), en plantas sin infectar (Mock) e infectadas tras 24h después de la inoculación con *Pst* (24hpi Pst). Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa entre las plantas transgénicas y su parental y la infección y la situación basal, con un *p*-value < 0.05.

Como indica la Figura 14, las plantas no transgénicas pGreen sometidas a un estrés biótico como una infección bacteriana, inducen la expresión de los genes *SOD* y *POD*, mientras que el gen *CAT* disminuye su expresión. Sin embargo, en las plantas transgénicas *35S:MTSI*, la expresión relativa de los tres genes es significativamente menor tras 24 h de infección por *Pst* que la de su parental.

Las especies reactivas de oxígeno se producen frente al reconocimiento de patógenos y están muy ligadas a la hormona SA (Cervilla et al., 2007). De hecho, cuando el patógeno penetra en el tejido vegetal, se acumula el SA y provoca la necrosis de la zona infectada debido a la producción de ROS (Nie et al., 2015). Se ha comprobado como las plantas transgénicas *NahG*, con niveles disminuidos de SA, acumulan menos cantidad de ROS en situación de estrés salino y osmótico (Borsani et al., 2001). Por tanto, se podría concluir que el SA potencia la acumulación de ROS.

La reducción en la expresión de genes encargados de la detoxificación de ROS en las plantas *35S:MTSI* puede deberse directamente a un menor nivel de ROS que ha de ser eliminados o indirectamente a una menor activación de otras rutas, como la de biosíntesis de SA. De este modo, los menores niveles de SA analizados en las plantas transgénicas supondrían una menor activación de la respuesta SAR, explicando así la menor activación de genes detoxificantes observada.

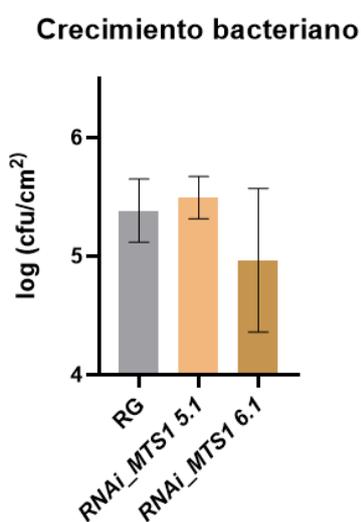
Por otra parte, se ha comprobado que algunos monoterpenos aplicados de forma exógena estimulan la acumulación de especies reactivas de oxígeno. En particular, tratamientos con  $\alpha$ -pineno en *Arabidopsis* provocan la acumulación de ROS como parte de la mejora de la respuesta defensiva mediada por monoterpenos (Riedlmeier et al., 2017). Esta evidencia contradice el resultado de una menor acumulación de especies reactivas de oxígeno en las plantas transgénicas *35S:MTSI*, pero hay que tener en cuenta que no siempre es posible comparar aproximaciones genéticas y químicas debido a las diferencias en concentración.

Por tanto, la menor activación de los genes detoxificantes de ROS observada en las plantas transgénicas *35S:MTSI* parecería deberse a una menor activación de la ruta de biosíntesis de SA, reforzando la importancia del SA frente a los monoterpenos en la respuesta defensiva.

## 2.2 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE *MTS1* EN LA RESPUESTA DEFENSIVA MEDIADA POR SA EN PLANTAS DE TOMATE

### 2.2.1 Estudio de la resistencia ante una infección bacteriana de las plantas transgénicas *RNAi:MTS1*

Previamente, en nuestro laboratorio, se había silenciado, mediante RNA interferente, la expresión de *MTS1* en plantas de tomate de la variedad ‘Rio Grande’ (Torres, 2018) (Figura 2S). Se quiso comprobar si el *cross-talk* propuesto a partir de los resultados obtenidos con las plantas *35S:MTS1*, se confirmaba en las plantas silenciadas, donde la síntesis de monoterpenos es menor y, por tanto, la acumulación de algunos precursores de la ruta MEP debería ser mayor según nuestra hipótesis.



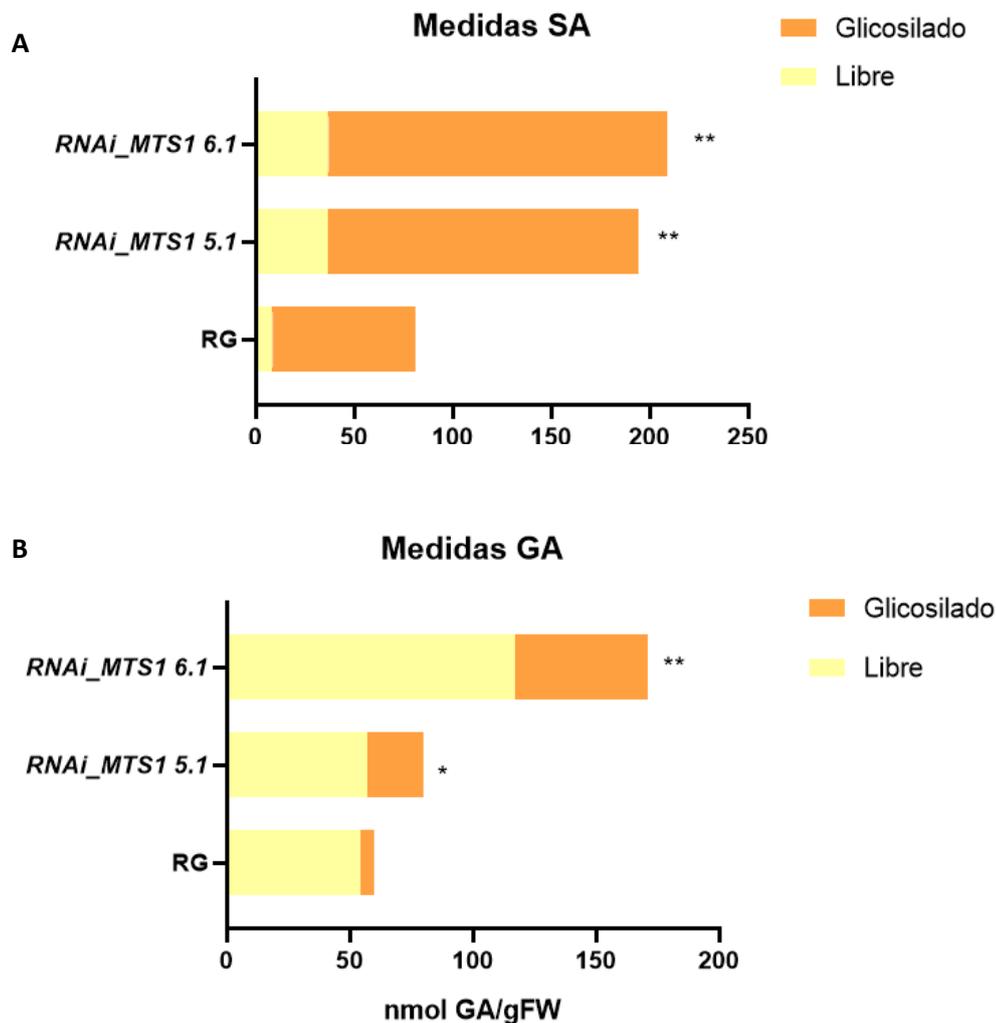
**Figura 15.** Crecimiento de *Pst* en plantas transgénicas de tomate *RNAi\_MTS1* (líneas 5.1 y 6.1; ocre) y su parental (‘Rio Grande’, RG; gris) tras 24h después de la inoculación con *Pst*. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 6 plantas independientes de un experimento representativo. Los asteriscos indican que existe una diferencia significativa de las plantas transgénicas y su parental, con un *p*-value < 0.05 y su ausencia que no hay diferencia significativa.

Como se observa en la figura 15 no se detectaron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano entre RG y las líneas silenciadas. Teniendo en cuenta las evidencias bibliográficas (Kiyama et al., 2021; Chen et al., 2018) y los resultados obtenidos tras los tratamientos con  $\alpha$ -terpineol, los monoterpenoides están implicados en la resistencia frente a patógenos, por lo que, el silenciamiento de *MTS1* debería suponer una mayor susceptibilidad de las plantas de tomate frente a *Pst*. Este resultado, por tanto, confirma el *cross-talk* elucidado a partir de las plantas *35S:MTS1*: el silenciamiento de *MTS1* supondría una acumulación de los precursores de la ruta MEP, entre ellos, el MEcPP que estimularía la transcripción del gen *ICS* encargado de la biosíntesis de SA. Esta supuesta acumulación de SA compensaría los niveles reducidos de monoterpenoides y por ello, las líneas *RNAi\_MTS1* no son más susceptibles que su parental RG.

### 2.2.2 Estudio de los niveles de acumulación de SA y GA en las plantas transgénicas *RNAi:MTS1*

Para comprobar si la no susceptibilidad de las plantas silenciadas se debía a una mayor acumulación de SA, que compensaría los niveles reducidos de monoterpenoides, se midieron los niveles de SA y GA por HPLC tras 24 h de la infección con *Pst*.

Como se puede observar en la Figura 16, los niveles de SA y GA en las plantas *RNAi\_MTS1*, resultaron ser significativamente mayores que en el parental ‘Rio Grande’ tras una infección con *Pst*.



**Figura 16.** Medidas de los niveles de SA (A) y GA (B) en plantas transgénicas *RNAi\_MTS1* (líneas 5.1, 6.1) y su parental ‘Rio Grande’ (RG) tras 24h después de la inoculación con *Pst*. Se representan los niveles totales como libres y glicosilados. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 5 plantas independientes de un experimento representativo. El simple (\*) y el doble (\*\*) asterisco indican que existe una significación estadística con un  $p$ -value < 0,05 y  $p$ -value < 0,005.

Por tanto, nuestros resultados parecen confirmar que existe un *cross-talk* negativo entre la biosíntesis de monoterpenos y la estimulación transcripcional de *ICS* y, por tanto, la producción de SA y su derivado metabólico GA. El silenciamiento de *MTS1*, enzima que

participa en un paso posterior a la síntesis de MEcPP, produciría la acumulación de éste, estimulando así a *ICS*, la biosíntesis de SA y la respuesta defensiva.

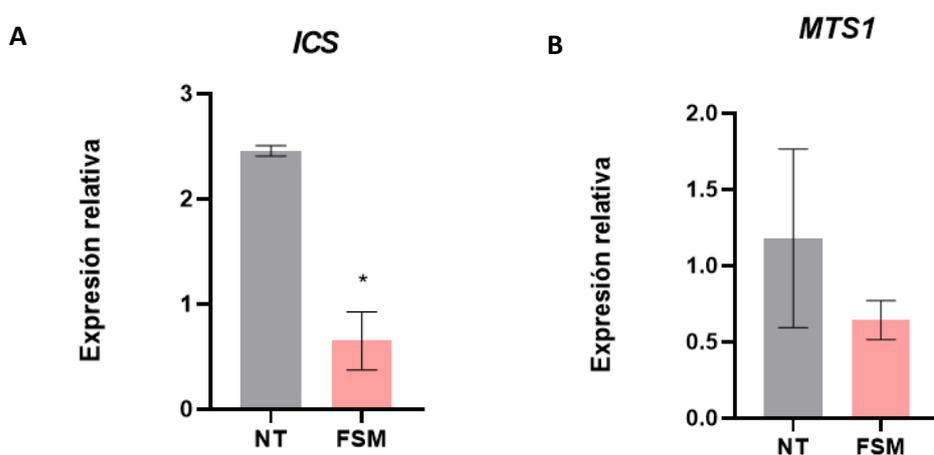
Las plantas transgénicas *RNAi\_MTS1* resultaron no ser más resistentes (Figura 15) a pesar de tener mayores niveles de SA (Figura 16A) y, por consiguiente, mayores niveles de expresión de PR1 (Figura 2S). Estos resultados sugieren que los monoterpenos juegan un papel muy importante en la respuesta defensiva.

Por tanto, desde dos aproximaciones genéticas independientes se ha confirmado la conexión entre la ruta de SA y la de los monoterpenos así como su relación con la respuesta defensiva de las plantas de tomate frente a *Pst*.

### 3 PAPEL DE LA RUTA DEL MEP EN LA RESPUESTA DEFENSIVA DE PLANTAS DE TOMATE FRENTE A *PSEUDOMONAS SYRINGAE* MEDIANTE TRATAMIENTO CON SU INHIBIDOR FOSMIDOMICINA

Con la finalidad de demostrar la conexión directa entre la ruta MEP precursora de los monoterpenos, la biosíntesis de SA y la resistencia de las plantas frente a una infección con *Pst*, se aplicó el inhibidor de dicha ruta, fosmidomicina (FSM), a 50  $\mu$ M y a las 24h se infectaron las plantas (ver Materiales y Métodos). La fosmidomicina es un análogo estructural de la 2-C-metileritritol 4-fosfato e inhibe específicamente la reductoisomerasa de DXP (DXS) que es la enzima clave de la biosíntesis de isoprenoides (Figura 4).

Se ha discutido anteriormente que hay evidencias de que el precursor MEcPP, posterior a la enzima DXS, activa transcripcionalmente a *ICS*, que codifica la enzima clave en la biosíntesis de SA (Gil et al., 2005; Xiao et al., 2012). Por tanto, se estudió el efecto que provoca la inhibición de la ruta MEP en la expresión de la enzima *ICS* en tomate mediante RT-qPCR (Figura 17A). Asimismo, se estudió si dicho tratamiento produce alteraciones sobre la expresión de *MTS1* (Figura 17B).

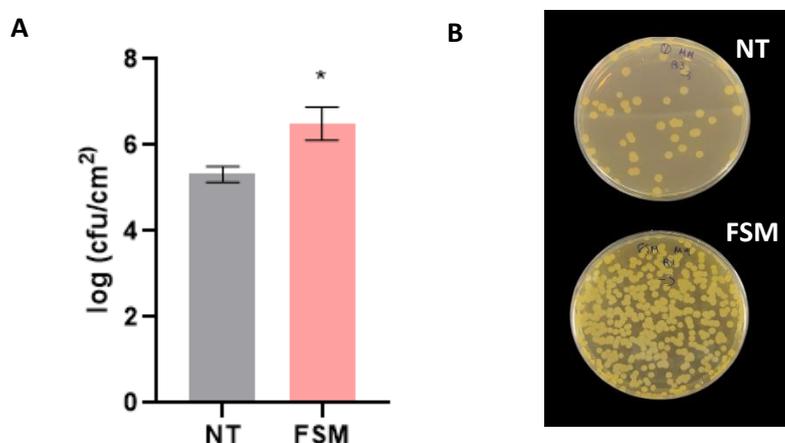


**Figura 17.** Niveles de expresión de los genes *ICS* (A) y *MTS1* (B) en plantas no tratadas (NT; gris) y tratadas con fosmidomicina (FSM; rosa) tras 24h después de la inoculación con *Pst*. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo. Los asteriscos

indican que existe una diferencia significativa de las plantas tratadas con FSM respecto a las plantas control, con un  $p$ -value  $< 0.05$ .

Como se puede comprobar en la Figura 17, la aplicación de FSM provoca la inhibición de la expresión relativa del gen *ICS* mientras que la expresión de *MTS1* no se ve significativamente alterada. Este resultado indica que la inhibición vía sustrato de la ruta MEP no afecta a los niveles de transcripción de *MTS1*, pero provoca un agotamiento de los precursores de la ruta MEP. Al inhibir la enzima DXS no se produce su producto, ni los precursores posteriores, entre los que se encuentran el MEcPP y, por tanto, no se activa transcripcionalmente *ICS*.

Por otra parte, una vez demostrada esta conexión, se quiso comprobar la importancia de la ruta MEP y su conexión con el SA en la resistencia de plantas de tomate frente a *Pst*. Para ello, se realizó un conteo bacteriano de las plantas tratadas y no tratadas con FSM.



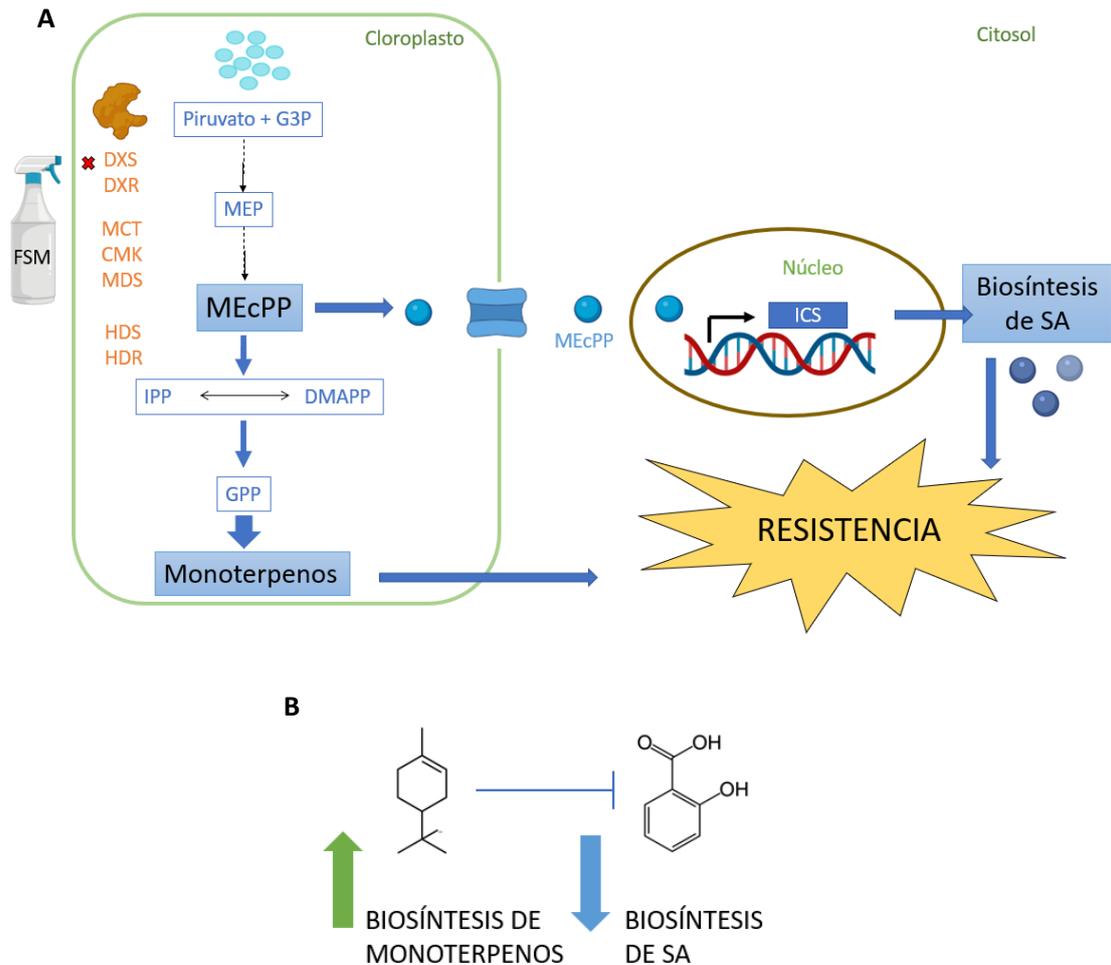
**Figura 18.** Crecimiento de *Pst* en plantas no tratadas (NT; gris) y tratadas con fosmidomicina (FSM; rosa) tras 24h después de la inoculación con *Pst*. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 6 plantas independientes de un experimento representativo. Los asteriscos indican que existe una diferencia significativa de las plantas pre-tratadas con FSM respecto a las plantas control, con un  $p$ -value  $< 0.05$ . (B) Placas Petri donde se observan el número de colonias crecidas en plantas MM no tratadas y en plantas tratadas 24 h antes de la infección con FSM.

Como se observa en la Figura 18, el número de colonias fue significativamente mayor en las plantas tratadas con FSM con respecto a las no tratadas. Este resultado indica que los tratamientos con FSM aumentan la susceptibilidad de las plantas de tomate frente a *Pst*. Este fenotipo esclarece la importancia de la ruta MEP en la resistencia de las plantas de tomate debido a que: 1) provoca la estimulación transcripcional de *ICS* y 2) permite la biosíntesis de los monoterpenoides, volátiles esenciales en la resistencia de las plantas de tomate frente a *Pst*. Por otra parte, la fosmidomicina provoca el cierre estomático (Possel et al., 2009; Figura 3S), lo que podría suponer una menor entrada de las bacterias al apoplasto vegetal. Sin embargo, la menor activación de las respuestas defensivas mediadas tanto por el SA como por los monoterpenos prevalece sobre dicha acción, puesto que la susceptibilidad de las plantas tratadas es mucho mayor.

Todos nuestros resultados parecen indicar que existe un *cross-talk* entre la respuesta defensiva mediada por los monoterpenos y la mediada por SA. Se propone que dicho *cross-talk* podría ocurrir a través del MEcPP. Dicho precursor de los monoterpenos es un compuesto retrógrado que produce la activación de la ruta de SA a través de la activación de ICS, enzima clave de la ruta de biosíntesis del SA (Gil et al., 2005; Xiao et al., 2012). Así pues, la activación de la ruta de biosíntesis de monoterpenos, llevaría consigo un bloqueo de la activación de la ruta de SA, puesto que ambas competirían por el MEcPP (Figura 19).

Nuestra hipótesis, por tanto, explicaría los resultados obtenidos. Por una parte, hemos visto que las plantas transgénicas *35S:MTSI* y *RNAi:MTSI* acumulan menos (Figura 13) y más (Figura 16) SA, respectivamente, probablemente debido a la menor o mayor disponibilidad de MEcPP. Por el mismo motivo, las plantas *35S:MTSI* emiten una menor cantidad de MeSA (Minguillón, 2018). Estos resultados correlacionan con una menor activación de los genes de biosíntesis y señalización de SA en las plantas *35S:MTSI* (Figuras 11 y 12). Por otra parte, el hecho de que las plantas transgénicas *35S:MTSI* y *RNAi:MTSI* no presenten una mayor (Figura 9) o menor (Figura 15) resistencia a *Pst*, a pesar de las diferencias en la apertura estomática observadas (Figura 8) también se explicaría por el *cross-talk* propuesto para ambas rutas.

En la Figura 19 proponemos un modelo de *cross-talk*, que tendría lugar a través del MEcPP, entre la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a la bacteria *Pst* mediada por los monoterpenoides y la respuesta defensiva mediada por SA.



**Figura 19. Modelo final que ilustra la conexión entre la ruta MEP y la biosíntesis del SA.** (A) Se representan las enzimas implicadas en la ruta MEP en naranja y los intermediarios más importantes en azul. La ruta MEP se estimula frente a un estrés biótico y el precursor retrógado MEcPP sale del cloroplasto y llega al núcleo donde estimula (de forma desconocida) la transcripción de la enzima ICS, encargada de la biosíntesis del SA. Tanto la activación de la ruta de los monoterpenos como la de biosíntesis de SA conlleva el cierre estomático y la activación de la respuesta defensiva y, por tanto, la resistencia. (B) Cross-talk entre la biosíntesis de monoterpenos y SA. La biosíntesis de monoterpenos bloquea la biosíntesis de SA por competición por el MEcPP.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras y continuación del proyecto en el laboratorio, se van a medir los niveles del supuesto precursor, MEcPP, que conecta la ruta MEP con la biosíntesis del SA. Sus niveles deberían ser menores tanto en el tratamiento con FSM, por la inhibición de la ruta MEP, como en las plantas *35S:MTS1*, por el agotamiento de los precursores y esto explicaría el fenotipo de estas plantas. Además, sería interesante poder aumentar la expresión de los genes que codifican las enzimas de la ruta MEP durante infecciones con *Pst* para provocar la acumulación del precursor MEcPP y de los monoterpenos, creando así plantas con respuestas defensivas aumentada y más resistentes.

Por otra parte, se va a realizar un estudio de la expresión diferencial de genes, RNA-seq, en cuatro situaciones: plantas sin tratar, plantas tratadas con  $\alpha$ -terpineol, plantas sin tratar e infectadas, plantas tratadas con  $\alpha$ -terpineol e infectadas. La finalidad de este estudio es comprobar qué genes de la respuesta defensiva se ven alterados tras el tratamiento con el  $\alpha$ -terpineol y qué rutas biosintéticas aumentan tras la infección, centrando la búsqueda en genes relacionados con la ruta MEP y la biosíntesis del SA. De esta forma, se indagará en la señalización mediada por el  $\alpha$ -terpineol y su implicación en la resistencia frente a patógenos. Además, ya se ha realizado un estudio preliminar, en base a otro RNA-seq realizado en plantas tratadas con HB, de los genes más sobre-expresados tras el tratamiento y se ha visto que uno de ellos se ve también muy inducido tras el tratamiento con  $\alpha$ -terpineol (Figura 4S), por lo que, se realizarán plantas *knock out* de este gen mediante CRISPR para comprobar cómo afecta a la respuesta defensiva.

Además, el hecho de que los monoterpenoides sean compuestos de naturaleza volátil, permitirá el estudio tanto con las plantas transgénicas *35S:MTS1* como con las silenciadas *RNAi\_MTS1* para comprobar si existe una comunicación entre plantas y los monoterpenos pueden funcionar también como moléculas señalizadoras de infecciones bacterianas en plantas vecinas, haciéndolas más resistentes.

## CONCLUSIONES

1. Tratamientos exógenos con  $\alpha$ -terpineol provocan el cierre estomático y la resistencia frente a *Pst* de forma independiente al SA.
2. Las plantas *35S:MTSI*, que sobre-emiten monoterpenoides, no son más resistentes a la bacteria *Pst* a pesar de tener los estomas más cerrados, por lo que el cierre estomático mediado por monoterpenoides no es suficiente para inducir resistencia.
3. Los genes implicados en la biosíntesis y degradación del SA se encuentran reprimidos en las plantas *35S:MTSI* infectadas por *Pst*, indicando que la sobreproducción de monoterpenoides disminuye la biosíntesis del SA a nivel transcripcional.
4. Las plantas *35S:MTSI* presentan menores niveles de SA y GA, así como un menor nivel de estrés oxidativo, lo que podría explicar que a pesar de sobre-emitar monoterpenos no presenten una mayor resistencia a *Pst*.
5. Las plantas *RNAi\_MTSI* presentan mayores niveles de SA y GA, lo que podría explicar que no presenten una menor resistencia a *Pst* a pesar de inhibir la producción de monoterpenoides.
6. El tratamiento con fosmidomicina (inhibidor de la ruta MEP) confirma la existencia de la conexión entre la ruta MEP y la transcripción del gen *ICS* de biosíntesis del SA.
7. Nuestros resultados parecen indicar que existe un *cross-talk* negativo entre la respuesta defensiva mediada por los monoterpenoides y la mediada por SA, que tiene lugar probablemente a través del MEcPP

## BIBLIOGRAFÍA

- Alazem, M., & Lin, N. S. (2015). Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology*. 16(5), 529–540. <https://doi.org/10.1111/mpp.12204>
- Belete, T. (2021). Plant Pathology & Microbiology A Critical Review on Defense Mechanisms of Plants against Bacterial Pathogens: From Morphological to Molecular Levels. *Plant Pathology*, 12(2), 534.
- Bellés JM, Garro R, Fayos J, Navarro P, Primo J, Conejero V, (1999). Gentisic Acid As a Pathogen-Inducible Signal, Additional to Salicylic Acid for Activation of Plant Defenses in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 227–235. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.3.227>
- Brading PA, Hammond-Kosack KE, Parr A, Jones JDG. (2000) Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant Journal*. 23, 305–318. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2000.00778.x>
- Campos, L., Granell, P., Tarraga, S., Lopez-Gresa, P., Conejero, V., Belles, J. M., et al. (2014). Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiology*. 77, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.016>
- Cervilla, L. M., Blasco, B., Ríos, J. J., Romero, L., & Ruiz, J. M. (2007). Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany*, 100(4), 747–756. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm156>
- Chen, X., Chen, H., Yuan, J. S., Köllner, T. G., Chen, Y., Guo, Y., Zhuang, X., Chen, X., Zhang, Y. jun, Fu, J., Nebenführ, A., Guo, Z., & Chen, F. (2018). The rice terpene synthase gene OsTPS19 functions as an (S)-limonene synthase in planta, and its overexpression leads to enhanced resistance to the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Biotechnology Journal*, 16(10), 1778–1787. <https://doi.org/10.1111/pbi.12914>
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G. (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Choudhary DK, Prakash A, Johri BN (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J Microbiol*. 4, 289-97. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>.
- Cui, H., Gobbato, E., Kracher, B., Qiu, J., Bautor, J., & Parker, J. E. (2017). A core function of EDS1 with PAD4 is to protect the salicylic acid defense sector in Arabidopsis immunity. *New Phytologist*, 213(4), 1802–1817. <https://doi.org/10.1111/nph.14302>
- de León, I. P., & Montesano, M. (2013). Activation of defense mechanisms against pathogens in mosses and flowering plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(2). 3178–3200. <https://doi.org/10.3390/ijms14023178>
- Degenhardt, J., Köllner, T. G., & Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70(16), 1621–1637. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030>
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E (1994) A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247–1250

- Ding P, Ding Y (2020) Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends Plant Science* 25, 549–565. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.004>
- Dong, F., Fu, X., Watanabe, N., Su, X., & Yang, Z. (2016). Recent advances in the emission and functions of plant vegetative volatiles. *Molecules*, 21(2), 124 <https://doi.org/10.3390/molecules21020124>
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1993) Requirement of salicylic Acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* (80) 261, 754–756. <https://doi.org/10.1126/science.266.5188.1247>
- Gao, Q. M., Zhu, S., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in plant science*, 6, 228. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>
- Gil, M. J., Coego, A., Mauch-Mani, B., Jordá, L., & Vera, P. (2005). The Arabidopsis *csb3* mutant reveals a regulatory link between salicylic acid-mediated disease resistance and the methyl-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Journal*, 44(1), 155–166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02517>
- Gimenez-Ibanez, S., Boter, M., Ortigosa, A., García-Casado, G., Chini, A., Lewsey, M. G., Ecker, J. R., Ntoukakis, V., & Solano, R. (2017). JAZ2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytologist*, 213(3), 1378–1392. <https://doi.org/10.1111/nph.14354>
- Gómez-Gómez L & Boller T. (2000). FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell*. 5(6), 1003-1011. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80265-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80265-8)
- Gómez-Gómez L, Boller T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, 7(6), 251-256. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02261-6](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02261-6)
- Granell A, Bellés JM, Conejero V (1987) Induction of pathogenesis-related proteins in tomato by citrus exocortis viroid, silver ion and ethephon. *Physiological Molecular Plant Pathology* 31, 83–90
- Hieno, A., Naznin, H. A., Hyakumachi, M., Higuchi-Takeuchi, M., Matsui, M., & Yamamoto, Y. Y. (2016a). Possible involvement of MYB44-mediated stomatal regulation in systemic resistance induced by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in Arabidopsis. *Microbes and Environments*, 31(2), 154–159. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME16025>
- Hieno, A., Naznin, H. A., Hyakumachi, M., Higuchi-Takeuchi, M., Matsui, M., & Yamamoto, Y. Y. (2016b). Possible involvement of MYB44-mediated stomatal regulation in systemic resistance induced by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in Arabidopsis. *Microbes and Environments*, 31(2), 154–159. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME16025>
- Hirano SS & Upper CD. (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(3), 624-53. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.624-653.2000>
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Hurley, B., Subramaniam, R., Guttman, D. S., & Desveaux, D. (2014). Proteomics of effector-triggered immunity (ETI) in plants. *Virulence*, 5(7), 752–760. <https://doi.org/10.4161/viru.36329>

- Jones, J., Dangl, J. (2006) The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Junker, R. R., & Tholl, D. (2013). Volatile Organic Compound Mediated Interactions at the Plant-Microbe Interface. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 810–825. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0325-9>
- Kabbas, E (2015). Estudio del papel de compuestos volátiles de tomate en la defensa frente a una infección bacteriana. Trabajo Final de Grado, Universitat Politecnica de Valencia, 56.
- Kang, J. H., McRoberts, J., Shi, F., Moreno, J. E., Jones, A. D., & Howe, G. A. (2014). The flavonoid biosynthetic enzyme chalcone isomerase modulates terpenoid production in glandular trichomes of tomato. *Plant Physiology*, 164(3), 1161–1174. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233395>
- Kiyama, H., Matsunaga, A., Suzuki, G., & Gomi, K. (2021). Monoterpene geraniol produced by rice terpene synthase 21 suppresses the expression of cell-division related genes in the rice bacterial pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2021.101673>
- Klessig, D. F., Choi, H. W., & Dempsey, D. A. (2018). Systemic acquired resistance and salicylic acid: Past, present, and future. In *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 31 (9), 871–888. *American Phytopathological Society*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR>
- Kumar, D. (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. In *Plant Science*. 228, 127–134. *Elsevier Ireland Ltd*. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.014>
- Lee, G. W., Chung, M. S., Kang, M., Chung, B. Y., & Lee, S. (2016). Direct suppression of a rice bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) by monoterpene (S)-limonene. *Protoplasma*, 253(3), 683–690. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0904-4>
- Li, X., Zhang, H., Tian, L., Huang, L., Liu, S., Li, D., & Song, F. (2015). Tomato SLRbohB, a member of the NADPH oxidase family, is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 6(6), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00463>
- Lieberherr, D., Wagner, U., Dubuis, P.-H., Métraux, J.-P., & Mauch, F. (2003). The Rapid Induction of Glutathione S-Transferases AtGSTF2 and AtGSTF6 by Avirulent *Pseudomonas syringae* is the Result of Combined Salicylic Acid and Ethylene Signaling. *Plant Cell Physiology*, 44(7), 750–757. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg093>
- López-Gresa MP, Payá C, Ozáez M, Rodrigo I, Conejero V, Klee H, Bellés JM and Lisón P (2018) A New Role For Green Leaf Volatile Esters in Tomato Stomatal Defense Against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Frontiers in Plant Science*. 9, 1855. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01855>
- López-Gresa MP, Payá C, Rodrigo I, Bellés JM, Barceló S, Hae Choi Y, Verpoorte R, Lisón P (2019). Effect of Benzothiadiazole on the Metabolome of Tomato Plants Infected by *Citrus Exocortis* Viroid. *Viruses*.11(5):437. <https://doi.org/10.3390/v11050437>
- 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., Lisón, P., Yenush, L., Conejero, V., Rodrigo, I., & Bellés, J. M. (2016). Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to citrus exocortis viroid and tomato spotted wilt virus. *PLoS ONE*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166938>
- Lowe-Power, T. M., Jacobs, J. M., Ailloud, F., Fochs, B., Prior, P., & Allen, C. (2016). Degradation of the plant defense signal salicylic acid protects *Ralstonia solanacearum* from toxicity and enhances virulence on tobacco. *Molecular Biology*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00656-16>
- Madani, B., Shekari, A. M., & Imahori, Y. (2018). Physiological responses to stress. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. 405–425. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00020-8>
- Melotto M, Zhang L, Oblessuc PR, He SY. (2017) Stomatal Defense a Decade Later. *Plant Physiology*.;174(2), 561-571. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01853>
- Melotto, M., Underwood, W., & Sheng, Y. H. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 46, 101–122. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.121107.104959>
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell*, 126(5), 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>
- Minguillón, S. (2018). Papel de MTS1 y S5H en la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae*. Trabajo Final de Máster, Universitat Politècnica de Valencia, 66.
- Mishina, T. E., & Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Journal*, 50(3), 500–513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03067>
- Mishra, A. K., & Baek, K. H. (2021). Salicylic acid biosynthesis and metabolism: A divergent pathway for plants and bacteria. *Biomolecules*. 11(5). <https://doi.org/10.3390/biom11050705>
- Narusaka, M., Shirasu, K., Noutoshi, Y., Kubo, Y., Shiraiishi, T., Iwabuchi, M., & Narusaka, Y. (2009). RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *Plant Journal*, 60(2), 218–226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03949>
- Negre-Zakharov, F, Long, M.C, Dudareva N. (2000). Floral scents and fruit aromas inspired by nature. *Plant-Derived Natural Products, Synthesis, Function, and Application*. 405–431.
- Nie, S., Yue, H., Zhou, J., & Xing, D. (2015). Mitochondrial-derived reactive oxygen species play a vital role in the salicylic acid signaling pathway in arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119853>
- Tárraga, S, Lisón, P., López-Gresa, MP., Torres, C., Rodrigo, I., Bellés, JM., Conejero, V. (2010) Molecular cloning and characterization of a novel tomato xylosyltransferase specific for gentisic acid, *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4325–4338, <https://doi.org/10.1093/jxb/erq234>
- Ogawa D, Nakajima N, Tamaoki M, Aono M, Kubo A, Kamada H, Saji H. (2007) The isochorismate pathway is negatively regulated by salicylic acid signaling in O3-exposed Arabidopsis. *Planta*. 226(5), 1277-85. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0556-5>

- Omar Borsani, Victoriano Valpuesta, Miguel A. Botella, (2001), Evidence for a Role of Salicylic Acid in the Oxidative Damage Generated by NaCl and Osmotic Stress in Arabidopsis Seedlings, *Plant Physiology*. 126(3), 1024–1030, <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1024>
- Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., & Cheng, Y. (2021). Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Frontiers in Plant Science* .12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276>
- Phuong, L., Fitrianti, A.N., Luan, M.T., Matsui, H., Noutoshi, Y., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T., & Toyoda, K. (2019). Antagonism between SA- and JA-signaling conditioned by saccharin in Arabidopsis thaliana renders resistance to a specific pathogen. *Journal of General Plant Pathology*, 86, 86 - 99. <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00899>
- Pichersky E, Noel JP & Dudareva N. (2006) Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*. 311(5762), 808-811. <https://doi.org/10.1126/science.1118510>
- Prodhan, M. Y., Munemasa, S., Nahar, M. N. E. N., Nakamura, Y., & Murata, Y. (2018). Guard cell salicylic acid signaling is integrated into abscisic acid signaling via the Ca<sup>2+</sup>/CPK-dependent pathway. *Plant Physiology*, 178(1), 441–450. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00321>
- Riedlmeier, M., Ghirardo, A., Wenig, M., Knappe, C., Koch, K., Georgii, E., Dey, S., Parker, J. E., Schnitzler, J. P., & Vlot, A. C. (2017). Monoterpenes support systemic acquired resistance within and between plants. *Plant Cell*, 29(6), 1440–1459. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00898>
- Sanzon, D & Zavaleta-Mejía, E. (2011) Hypersensitive Reaction, a Programmed Cell Death to Defend from Attack by Plant Pathogens. 29, 154-164.
- Singh, A., & Singh, I. K. (2018). Molecular aspects of plant-pathogen interaction. *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7>
- Sugimoto, K., Zager, J. J., Aubin, B. S., Lange, B. M., & Howe, G. A. (2021). Flavonoid deficiency disrupts redox homeostasis and terpenoid biosynthesis in glandular trichomes of tomato. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab488>
- Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N., & Hasezawa, S. (2005). Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138(4), 2337–2343. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063503>
- Thomazella D, Seong K, Mackelprang R, Dahlbeck D, Geng Y, Gill U, Qi T, Pham J, Giuseppe P, Lee C, et al (2021) Loss of function of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. PNAS, 118 (27) <https://doi.org/10.1073/PNAS.2026152118>
- Toffolatti, S. L., Maddalena, G., Passera, A., Casati, P., Bianco, P. A., & Quaglino, F. (2021). Role of terpenes in plant defense to biotic stress. *Biocontrol Agents and Secondary Metabolites*. 401–417. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822919-4.00016-8>
- Tornero P, Rodrigo I, Conejero V, Vera P (1993) Nucleotide sequence of a cDNA encoding a pathogenesis-related protein, p1-p14, from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiology* 102, 325
- Torrens-Spence, M. P., Bobokalonova, A., Carballo, V., Glinkerman, C. M., Pluskal, T., Shen, A., & Weng, J. K. (2019a). PBS3 and EPS1 Complete Salicylic Acid Biosynthesis from Isochorismate in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 12(12), 1577–1586. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.11.005>

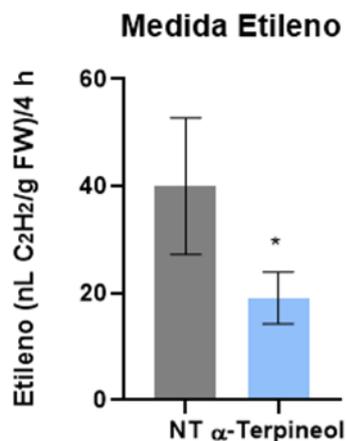
- Torrens-Spence, M. P., Bobokalonova, A., Carballo, V., Glinkerman, C. M., Pluskal, T., Shen, A., & Weng, J. K. (2019b). PBS3 and EPS1 Complete Salicylic Acid Biosynthesis from Isochorismate in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 12(12), 1577–1586. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.11.005>
- Torres, A. (2018) Estudio de la función y mecanismo de acción de *MTS1* en la respuesta defensiva de plantas de tomate de *Solanum Lycopersicum* frente a la infección con *Pseudomonas syringae*. Trabajo Final de Grado, Universitat Politecnica de Valencia 48.
- van Gelder, K., Forrester, T., & Akhtar, T. A. (2020). Evidence from stable-isotope labeling that catechol is an intermediate in salicylic acid catabolism in the flowers of *Silene latifolia* (white campion). *Planta*, 252(1). <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03410-5>
- Van Schie CCN, Haring MA, Schuurink RC, (2007). Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Molecular Biology* 64, 251–263. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9149-8>
- Velásquez, A. C., Oney, M., Huot, B., Xu, S., & He, S. Y. (2017). Diverse mechanisms of resistance to *Pseudomonas syringae* in a thousand natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 214(4), 1673–1687. <https://doi.org/10.1111/nph.14517>
- Wang, H. Q., Sun, L. P., Wang, L. X., Fang, X. W., Li, Z. Q., Zhang, F. F., Hu, X., Qi, C., & He, J. M. (2020). Ethylene mediates salicylic-acid-induced stomatal closure by controlling reactive oxygen species and nitric oxide production in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 294. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110464>
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling and Behavior*. 7(10). <https://doi.org/10.4161/psb.21663>
- Wildermuth, M., Dewdney, J., Wu, G. & Ausubel F., (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562–565. <https://doi.org/10.1038/35107108>
- Xiao, Y., Savchenko, T., Baidoo, E. E. K., Chehab, W. E., Hayden, D. M., Tolstikov, V., Corwin, J. A., Kliebenstein, D. J., Keasling, J. D., & Dehesh, K. (2012). Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell*, 149(7), 1525–1535. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.038>
- Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. *Nature*, 16(5), 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>
- Yan J, Zhang C, Gu M, Bai Z, Zhang W, Qi T, Cheng Z, Peng W, Luo H, Nan F, Wang Z, Xie D. (2009) The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell*. 21(8):2220-36. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.065730>
- Yan, S., & Dong, X. (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid *Current Opinion in Plant Biology*. 20, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.006>
- Yang, X., Chen, L., Yang, Y., Guo, X., Chen, G., Xiong, X., Dong, D., & Li, G. (2020). Transcriptome analysis reveals that exogenous ethylene activates immune and defense responses in a high late blight resistant potato genotype. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78027-5>

- Zebec, Z., Wilkes, J., Jervis, A. J., Scrutton, N. S., Takano, E., & Breitling, R. (2016a). Towards synthesis of monoterpenes and derivatives using synthetic biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 34, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.002>
- Zebec, Z., Wilkes, J., Jervis, A. J., Scrutton, N. S., Takano, E., & Breitling, R. (2016b). Towards synthesis of monoterpenes and derivatives using synthetic biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 34, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.002>
- Zeier, J. (2021). Metabolic regulation of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 62. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102050>
- Zeng, W., & He, S. Y. (2010). A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 153(3), 1188–1198. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157016>
- Zhang, Y. J., Zhao, L., Zhao, J. Z., Li, Y. J., Wang, J. bin, Guo, R., Gan, S. S., Liu, C. J., & Zhanga, K. W. (2017). S5H/DMR6 encodes a salicylic acid 5-hydroxylase that fine-tunes salicylic acid homeostasis. *Plant Physiology*, 175(3), 1082–1093. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00695>
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., & Dong, X. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. 96.
- Zhou F, Robert L, Pichersky E. (2021). Degradation of salicylic acid to catechol in Solanaceae by SA 1-hydroxylase. *Plant Physiology*, 185(3), 876–891, <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa096>.

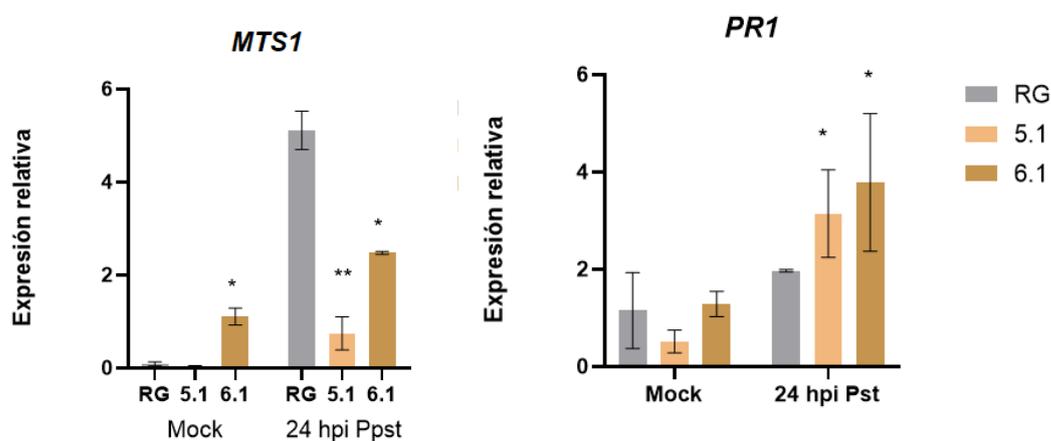
## ANEXOS

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

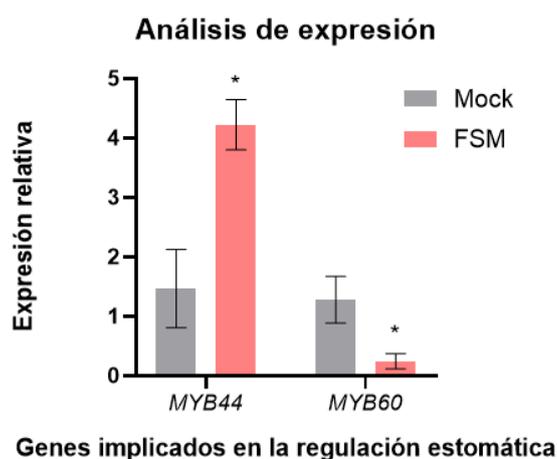
<i>Gen</i>	<i>Primer Foward</i>	<i>Primer Reverse</i>
<i>ICS</i>	5' TGC CTC ATG GAC ATA CCA GA 3'	5' TAT GCG AAT GGG GAT TTT TTC 3'
<i>PR1</i>	5' ACT CAA GTA GTC TGG CGC AAC TCA 3'	5' AGT AAG GAC GTT GTC CGA TCG AGT 3'
<i>S5H</i>	5' GGG ATG TCC CGG AAG TAA GT 3'	5' GGC ATT GGA TGG GAT ATT CA 3'
<i>MYB44</i>	5' GGG AGT CGA ACA AAA GCA AC 3'	5' TCC AAG CCC TAA ACC ACT TG 3'
<i>MTS1</i>	5' TGG TGG TCA CCT TCA AGA GA 3'	5' GCC TTG TGG AAA TAG GA 3'
<i>Actina</i>	5' CTA GGC TGG GTT CGC AGG AGA TGA TGC 3'	5' GTC TTT TTG ACC CAT ACC CAC CAT CAC AC 3'
<i>PAL</i>	5' GCC AAG CTA TCG ACT TGA GG 3'	5' ATT AGC ACC CAT TGC CAG AG 3'
<i>EPS1</i>	5' TTG CAA GCT TAC TTG GCT CA 3'	5' GCA TTG CAA CCC ATC CTA GT 3'
<i>S5H</i>	5' CAC TCA ACC CTC CCT CAA TC 3'	5' ACA TAT CAA TGA CTG GAC AAG A 3'
<i>POD</i>	5' TTG GAG TGT CTC GTT GCT 3'	5' TTC ACC AGC ACT CCC TGT 3'
<i>CAT</i>	5' CAA GTT CGC CAT GCT GAG GT 3'	5' AGC CTG AGA CCA GTA TGT GAT CCA A 3'
<i>SOD</i>	5' CTT CAC CAC AAC CAG CAC TAC CA 3'	5' TCC AGG AGC AAG TCC AGT TAT ACG 3'



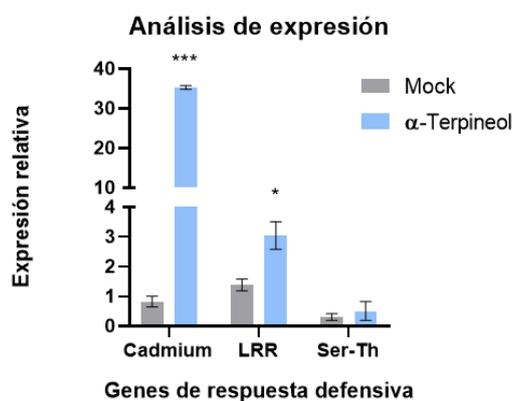
**Figura 1S.** Niveles de ET en hojas de plantas de tomate tratadas con agua (NT; gris) y con terpineol (azul) infectadas con *P. syringae*. Los niveles de ET fueron determinados a los 24 h días post-inoculación (dpi). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 6 plantas independientes de un experimento representativo. Los asteriscos indican que existe una diferencia significativa de las plantas pre-tratadas con  $\alpha$ -terpineol respecto a las plantas control, con un p-value  $< 0.05$ .



**Figura 2S.** Expresión de los genes *MTS1* y *PR1* y conteo bacteriano en líneas de silenciamiento de *MTS1* (*iRNA\_MTS1*; 5.1 y 6.1). (A) Expresión *MTS1* en plantas 'Rio Grande' (RG) y *iRNA\_MTS1* mock e infectadas con *Pst* tras 24 horas post-inoculación (B) Expresión *PR1* en plantas 'Rio Grande' (RG) y *iRNA\_MTS1* mock e infectadas con *Pst* tras 24 horas post-inoculación. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco indica diferencias significativas con un p-value  $< 0.05$  entre las diferentes muestras.



**Figura 3S.** Expresión de los genes *MYB44* y *MYB60* en plantas *MM* sin tratar (*Mock*) y tratadas con fosmidomicina (*FSM*) a 50  $\mu\text{M}$  24 h. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco indica diferencias significativas con un  $p\text{-value} < 0.05$  entre las diferentes muestras.



**Figura 4S.** Expresión de los genes más activos obtenidos tras un RNA-seq Cadmium, LRR y Ser-Th en plantas *MM* sin tratar (*Mock*) y tratadas con  $\alpha$ -terpineol 5  $\mu\text{M}$  en cajas de metacrilato 24 h. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco indica diferencias significativas con un  $p\text{-value} < 0.05$  y el triple asterisco  $p\text{-value} < 0.001$  entre las diferentes muestras.