



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Estudio del papel de la ruta de las oxilipinas en la  
interacción tomate-*Pseudomonas syringae*.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Calderay Toscano, Gabriel

Tutor/a: Pérez Pérez, Julia

Cotutor/a: Lisón Párraga, María Purificación

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio  
Natural**

**Estudio del papel de la ruta de las  
oxilipinas en la interacción tomate-  
*Pseudomonas syringae*.**

**Trabajo de Fin de Grado**

**Titulación:** Biotecnología

**Autor:** Gabriel Calderay Toscano

**Directoras:** Dra. Julia Pérez Pérez;  
Dra. María Purificación Lisón Párraga

**Curso:** 2022/2023

**Valencia, junio 2023**

## RESUMEN

### Estudio del papel de la ruta de las oxilipinas en la interacción tomate-*Pseudomonas syringae*.

En respuesta a un estrés biótico, las plantas sintetizan compuestos defensivos que limitan el crecimiento de los patógenos. Estos compuestos pueden actuar de forma directa sobre el patógeno impidiendo su crecimiento o, de forma indirecta, actuando como moléculas señal de las defensas vegetales. En este segundo grupo de compuestos se encuentran las oxilipinas, moléculas señal derivadas de los ácidos grasos libres, principalmente del ácido linoleico.

El paso fundamental para la biosíntesis de oxilipinas consiste en la oxidación del ácido graso por medio de las lipoxigenasas (LOX). Dicha oxidación produce un metabolito que es sustrato tanto de la hidroperóxido liasa (HPL), que sintetiza los denominados volátiles de hoja verde (Green Leaf Volatiles; GLVs), como de la aleno óxido sintasa (AOS) que produce el ácido jasmónico (JA).

Se ha descrito que los GLVs se emiten de manera diferencial por plantas de tomate que resisten eficazmente una infección causada por patógenos hemibiotrofos, como la bacteria *Pseudomonas syringae* (*Pst*). Asimismo, algunos de ellos producen la activación de la respuesta defensiva y el cierre estomático, aumentando así la resistencia de la planta frente a *Pst*. Por lo tanto, los GLVs podrían considerarse como moléculas señal de la respuesta defensiva frente a patógenos hemibiotrofos. En este trabajo se han estudiado plantas de tomate *knock-out* para el gen *AOS*, obtenidas en nuestro laboratorio mediante la tecnología de CRISPR-Cas9 (*CRISPR\_AOS12.1*). En particular, se ha llevado a cabo la caracterización química, molecular y fenotípica de las plantas de tomate *CRISPR\_AOS12.1* frente a una infección con *Pst*. La mutación de *AOS* produciría la redirección de los precursores de la ruta de las oxilipinas hacia la síntesis de GLVs, con la consiguiente reducción de los niveles de JA.

Por otra parte, el JA es una molécula señal de la respuesta defensiva frente a insectos, herida y patógenos necrotrofos. Su acumulación en la planta lleva consigo la síntesis de los denominados inhibidores de proteasas (PIs) que inhiben las enzimas del tracto digestivo de los insectos, limitando así su crecimiento y desarrollo. En este trabajo se han estudiado plantas de tomate que sobreexpresan el inhibidor de proteasas *TCI21* (*OE:TCI21*), implicadas en la respuesta defensiva mediada por JA. Se tienen evidencias que indican que los PIs podrían también jugar un papel defensivo frente a estreses causados por patógenos hemibiotrofos, como la infección por *Pst*. Por lo que, en este trabajo se ha realizado un estudio de la expresión diferencial de *TCI21* en diferentes contextos defensivos y se ha estudiado la resistencia de las plantas transgénicas *OE:TCI21* frente a *Pst*, con la finalidad de elucidar el papel defensivo de estas proteínas frente a bacterias.

El presente TFG está altamente relacionado con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) 2, 12, 13 y 5 de la Agenda 2030.

**Palabras clave:** tomate; bacteria; volátiles; inhibidores de proteasas; señalización.

**Autor:** Gabriel Calderay Toscano

**Directoras:** Dra. Julia Pérez Pérez; Dra. María Purificación Lisón Párraga

Valencia, junio 2023

## ABSTRACT

### Study of the role of the oxylipin pathway in the tomato-*Pseudomonas syringae* interaction.

In response to a biotic stress, plants synthesize defensive compounds that limit the growth of pathogens. These compounds can act directly on the pathogen, avoiding their growth, or in an indirect manner, acting as plant defense signal molecules. In the latter group of compounds oxylipins can be found, being signaling molecules derived from free fatty acids, mainly linoleic acid.

The key step in the oxylipin biosynthesis consists of the oxidation of fatty acids by lipoxygenases (LOX). This oxidation produces an intermediary metabolite that is a common substrate for the lyase hydroperoxide (HPL), which leads to the synthesis of the so-called Green Leaf Volatiles (GLVs), and the allene oxide synthase (AOS), which implies the synthesis of jasmonic acid (JA).

It has been described that GLVs are differentially emitted by tomato plants that effectively resist an infection caused by hemibiotrophic pathogens, such as the bacterium *Pseudomonas syringae* (*Pst*). Additionally, some of them produce the defensive response activation and the stomatal closure, increasing the resistance of the plant against *Pst*. Therefore, GLVs could be considered as defensive response signaling molecules against hemibiotrophic pathogens. In this project tomato plants obtained in our laboratory by CRISPR-Cas9 technology with a *knockout AOS* gene (*CRISPR\_AOS12.1*) has been studied and characterized. Specifically, it has been performed the chemical, molecular and phenotypical characterization of the *CRISPR\_AOS12.1* tomato plants against *Pst* infection. The *AOS* mutation would produce the redirection of the precursors belonging to the oxylipin route to the synthesis of GLVs, consequently reducing the levels of JA.

On the other hand, JA is a defensive response signal molecule against insects, wound and necrotrophic pathogens. Its accumulation in the plant leads to the synthesis of the so-called protease inhibitors (PIs) that inhibit the digestive tract enzymes from insects, limiting their growth and development. In this project tomato plants overexpressing the *TCI21* protease inhibitor (*OE:TCI21*), which are involved in the JA defense response, have been studied. There are evidence indicating that PIs could also play an important defensive role against hemibiotrophic-caused stresses, such as the *Pst* infection. Consequently, in this project, a *TCI21* differential expression study in different defense contexts has been studied, as well as the *OE:TCI21* transgenic plant resistance against *Pst*, aiming to elucidate the defensive role of these proteins against bacteria.

The current TFG is highly related to the Sustainable Development Goals (ODS) 2, 12, 13 and 5 from the 2030 Agenda.

**Keywords:** tomato; bacteria; volatiles; protease inhibitors; signaling.

**Author:** Gabriel Calderay Toscano

**Directors:** Dr. Julia Pérez Pérez; Dr. María Purificación Lisón Párraga

Valencia, June 2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría expresar mi más sincera gratitud a todas las personas que me han ayudado a realizar este Trabajo de Fin de Grado.

En primer lugar, me gustaría daros las gracias a Puri y Mapi por haberme ofrecido esta oportunidad y vuestra comprensión en toda ocasión. Gracias a vosotras he podido aprender a desenvolverme en el laboratorio y a pensar como un gran investigador.

A Julia, que me ha acompañado durante toda esta aventura, resolviendo cualquier duda que me planteara. Tú sabes que no todo ha sido un camino liso y sin pendiente, sino con subidas y bajadas, como la vida misma. Muchas gracias por todas las risas, enseñarme a organizar el tiempo y las veces que has ofrecido tu ayuda.

Al resto del equipo: Paco, Ismael, José María, Carmen, Fran, Eneritz, Marc y Cynthia, no me olvido de vosotros, os agradezco haberme arropado como Puri, Mapi y Julia lo han hecho, y hacerme sentir como uno más del laboratorio desde el primer momento. Contar con un equipo así es crucial y me siento afortunado por ello.

También me gustaría agradecer al Ministerio de Educación y Formación Profesional por concederme la beca de Colaboración en Departamentos universitarios, ya que para mí ha sido un impulso motivador en el mundo de la investigación.

Tampoco me olvido de vosotros, mis queridos amigos de Huelva y Valencia. A vosotros me gustaría agradecer todos los momentos que hemos vivido y vuestra gran paciencia cuando el estrés aparecía. Habéis sido un gran apoyo para mí y estoy muy agradecido de todo el círculo que me rodea.

Por último y para nada menos importante, muchas gracias, Mamá, Papá y Francis. A pesar de que la distancia nos permita vernos sólo en vacaciones, agradezco de corazón el apoyo que me habéis mostrado durante toda mi vida y la paciencia y serenidad que me habéis aportado durante este proyecto. Realmente, sin vuestro apoyo no estaría en Valencia escribiendo estos agradecimientos.

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

# ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS .....	VI
ÍNDICE DE ECUACIONES .....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS .....	VII
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. El sistema defensivo de las plantas. ....	1
1.1.1. La respuesta defensiva de las plantas frente a <i>Pseudomonas syringae</i> .....	1
1.1.2. La respuesta defensiva de las plantas frente a insectos. ....	3
1.2. Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs): biosíntesis y papel en la respuesta defensiva de la planta.....	5
1.3. La ruta biosintética de las oxilipinas y su papel en la respuesta defensiva de la planta frente a bacteria.....	6
1.3.1. Volátiles de hoja verde (GLVs).....	7
1.3.2. Ruta biosintética del JA.....	8
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Materiales y Métodos. ....</b>	<b>9</b>
3.1. Material vegetal y microbiológico.....	9
3.1.1. Germinación de semillas. ....	9
3.1.2. Condiciones de cultivo de las plantas en invernadero. ....	9
3.2. Recogida de muestras. ....	10
3.3. Infecciones con <i>Pseudomonas syringae</i> . ....	10
3.3.1. Preparación del inóculo.....	10
3.3.2. Infección. ....	10
3.3.3. Conteo bacteriano. ....	11
3.4. Medida de la expresión de transcritos mediante RT-qPCR.....	11
3.4.1. Extracción y cuantificación de RNA. ....	11
3.4.2. Retrotranscripción.....	11
3.4.3. Amplificación cuantitativa de cDNA. ....	12
3.5. Análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	12
3.6. Análisis de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). ....	13
3.7. Análisis estadísticos. ....	14

<b>4. Resultados y Discusión</b> .....	<b>14</b>
4.1. Implicación de los GLVs en la resistencia frente a <i>Pst</i> .....	14
4.1.1. Estudio de los niveles de acumulación de SA y GA en plantas <i>CRISPR_AOS12.1</i> .....	15
4.1.2. Análisis de expresión de <i>TomLoxF</i> , <i>HPL</i> y <i>AAT1</i> .....	18
4.1.3. Señalización mediada por JA y SA en plantas <i>CRISPR_AOS12.1</i> .....	20
4.1.4. Respuesta defensiva de las plantas <i>CRISPR_AOS12.1</i> ; implicación de los GLVs en la defensa frente a <i>Pst</i> .....	22
4.2. Elucidación del papel defensivo del inhibidor de proteasas TCI21.....	24
4.2.1. Estudio de la expresión diferencial de <i>TCI21</i> en diferentes contextos defensivos. ....	24
4.2.1.1. Infección por <i>Pst</i> virulenta ( $\Delta$ AvrPto) y avirulenta (AvrPto).....	24
4.2.1.2. Infección con Citrus Exocortis Viroid (CEVd). ....	25
4.2.1.3. Infección con Tomato spotted wilt virus (TSWV). ....	25
4.2.1.4. Tratamientos exógenos con monoterpenoides.....	26
4.2.2. Estudio del papel de TCI21 en la respuesta defensiva y la resistencia frente a <i>Pst</i> . ....	27
4.3. Perspectivas futuras. ....	30
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>31</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>31</b>
<b>7. Anexos</b> .....	<b>38</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Modelo en zig-zag del sistema inmune de las plantas.</b> .....	<b>2</b>
<b>Figura 2. Visión general de las rutas biosintéticas de compuestos orgánicos volátiles (VOCs).</b> .....	<b>6</b>
<b>Figura 3. Ruta de las oxilipinas o lipoxigenasas (LOX).</b> .....	<b>7</b>
<b>Figura 4. Análisis de la emisión de VOCs en plantas tomate mutadas en AOS (<i>CRISPR_AOS12.1</i>) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con <i>Pst</i> (inf).</b> .....	<b>15</b>
<b>Figura 5. Medidas de los niveles de SA (A) y GA (B) en plantas de tomate mutadas en AOS (<i>CRISPR_AOS12.1</i>) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con <i>Pst</i> (inf).</b> ....	<b>16</b>
<b>Figura 6. Nivel de expresión del gen <i>S5H</i> en plantas de tomate mutadas en AOS (<i>CRISPR_AOS12.1</i>) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con <i>Pst</i> (inf).</b> ....	<b>17</b>
<b>Figura 7. Nivel de expresión del gen <i>TomLoxF</i> en plantas de tomate mutadas en AOS (<i>CRISPR_AOS12.1</i>) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con <i>Pst</i> (inf).</b> .....	<b>18</b>
<b>Figura 8. Nivel de expresión del gen <i>HPL</i> en plantas de tomate mutadas en AOS (<i>CRISPR_AOS12.1</i>) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con <i>Pst</i> (inf).</b> ....	<b>19</b>

Figura 9. Nivel de expresión del gen AAT1 en plantas de tomate mutadas en AOS (CRISPR_AOS12.1) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con Pst (inf). .....	20
Figura 10. Nivel de expresión del gen TCI21 en plantas de tomate mutadas en AOS (CRISPR_AOS12.1) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con Pst (inf). .....	21
Figura 11. Nivel de expresión del gen PR1 en plantas de tomate mutadas en AOS (CRISPR_AOS12.1) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con Pst (inf). .....	22
Figura 12. Crecimiento de Pst en plantas de tomate mutadas en AOS (CRISPR_AOS12.1) y su parental MM 24 h después de la inoculación con Pst.....	23
Figura 13. Nivel de expresión del gen TCI21 en plantas de tomate Rio Grande sin infectar (Mock), infectadas por Pst virulenta ( $\Delta$ AvrPto) y avirulenta (AvrPto).....	24
Figura 14. Nivel de expresión del gen TCI21 en plantas de tomate MM sin infectar (Mock) e infectadas por el viroide (Citrus Exocortis Viroid, CEVd). .....	25
Figura 15. Nivel de expresión del gen TCI21 en plantas de tomate MM sin infectar (Mock) e infectadas por el virus (Tomato spotted wilt virus, TSWV). .....	26
Figura 16. Nivel de expresión del gen TCI21 en plantas de tomate MM no tratadas (NT) y tratadas con 4-terpineol, $\alpha$ -terpineol, limoneno y linalool.....	27
Figura 17. Nivel de expresión del gen TCI21 en plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan TCI21 (OE:TCI21) y su parental (Rutgers) sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con Pst (inf).....	28
Figura 18. Crecimiento de Pst en plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan TCI21 (OE:TCI21) y su parental (Rutgers) 24 h después de la inoculación con Pst.....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medio de cultivo LB agar.....	10
Tabla 2. Medio de cultivo King B líquido.....	10
Tabla 3. Medio de cultivo King B Agar. ....	11
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados como cebadores en los experimentos de RT-qPCRs. ....	12

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Logaritmo en base 10 de CFU/cm <sup>2</sup> . .....	11
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

12,13-EOTr: ácido linolenico 12-óxido de aleno

13-(S)-HPOTrE: ácido 13-(S)-hidroxiperoxilinolénico

AAT: Alcohol acetiltransferasa

AAT1: Alcohol aciltransferasa 1

ABA: Ácido abscísico

ADH: Alcohol deshidrogenasa

ANOVA: Análisis de la varianza

AOC: óxido aleno ciclasa

AOS: Aleno óxido sintasa

Avr: Avirulencia

BSMT1: Salicilato/benzoato carboxil metiltransferasa

CEVd: Citrus Exocortis Viroid

CFU: Unidades formadoras de colonias

D.O.: Densidad óptica

E4P: Eritrosa 4-fosfato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ET: Etileno

ETI: Effector-Triggered Inmunity

ETS: Effector-Triggered Susceptibility

FLS2: Flagelling-sensitive 2

GA: Ácido gentísico

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

GLVs: Volátiles de hoja verde

HA: Acetato de (Z)-3-hexenilo

HB: Butanoato de (Z)-3 hexenilo

HiB: Isobutanoato de (Z)-3-hexenilo

HP: Propanoato de (Z)-3-hexenilo

HPL: Hidroperóxido liasa

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HR: Respuesta hipersensible  
HS-SPME: Head Space Solid-Phase Microextraction  
ICS1: Isocorismato sintasa 1  
IE: Impacto electrónico  
JA: Ácido jasmónico  
JIP21: Proteína 21 inducida por jasmónico  
LB: Medio Luria Bertani  
LOX: Lipoxigenasa  
LRR: Leucine-Rich Repeats  
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos  
MEP: Metileritritol fosfato  
MM: MoneyMaker  
MVA: Ácido mevalónico  
NIST: Instituto Nacional de Estándares y Tecnología  
NT: No tratada  
OA: Ácido orto-anísico  
OPDA: ácido 12-oxo-fitodienoico  
PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns  
PDA: Ácido fitodienoico  
PEP: Fosfoenol piruvato  
PIN: Inhibidores de proteinasas  
Pin1: Inhibidor de proteasa de tipo I de patata  
PIs: Inhibidores de proteasas  
PKPI: Inhibidor de proteasas de tipo-Kunitz  
PR1: Pathogenesis-Related 1  
PRRs: Receptores Reconocedores de Patrones  
PRs: Pathogenesis Related proteins  
Pst  $\Delta$ AvrPto: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 virulenta  
Pst AvrPto: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avirulenta  
Pst: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

PTI: PAMP Triggered Immunity  
PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados  
R: Genes de resistencia  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real  
S5H: Salicilato 5-Hidroxilasa  
SA: Ácido salicílico  
SAR: Respuesta sistémica adquirida  
TCI21: Inhibidor 21 de quimotripsina  
TSWV: Tomato spotted wilt virus  
TTSS: Sistema de secreción de tipo III  
VOCs: Componentes orgánicos volátiles  
WT: Wild type

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El sistema defensivo de las plantas.

Las plantas están expuestas en la naturaleza a factores hostiles, como son los estreses abiótico y biótico que afectan a su crecimiento y desarrollo. En este trabajo nos vamos a centrar en el estrés biótico, que ocurre cuando las plantas sufren infecciones mediadas por viroides, virus, bacterias u hongos, así como cuando sufren el ataque de insectos.

En este contexto, las plantas deben defenderse, por ello han desarrollado mecanismos defensivos clasificados como respuesta innata e inducible. La respuesta innata es una barrera física inicial que los patógenos tienen que superar en las plantas y entre las que encontramos la pared celular vegetal, la presencia de espinas y los tricomas. Por otro lado, la respuesta inducible consiste en el reconocimiento de elicitores de los patógenos por parte de las plantas, que conlleva a la activación de respuestas que involucran cambios transcripcionales y metabólicos, como la síntesis de proteínas de defensa, compuestos antimicrobianos o la muerte celular programada (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). En esta respuesta destacan las proteínas defensivas PR (*Pathogenesis-related*), que aumentan su expresión durante un ataque patogénico (Madani *et al.*, 2019) y los inhibidores de proteasas (PIN; *proteinase inhibitors*) que se acumulan en las plantas como respuesta a un ataque de insectos (Haq *et al.*, 2004). Además, intervienen rutas hormonales que tienen un papel esencial en la señalización frente al estrés biótico, mediante la activación conjunta de las rutas del ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) o etileno (ET) (Alazem y Lin, 2015).

### 1.1.1. La respuesta defensiva de las plantas frente a *Pseudomonas syringae*.

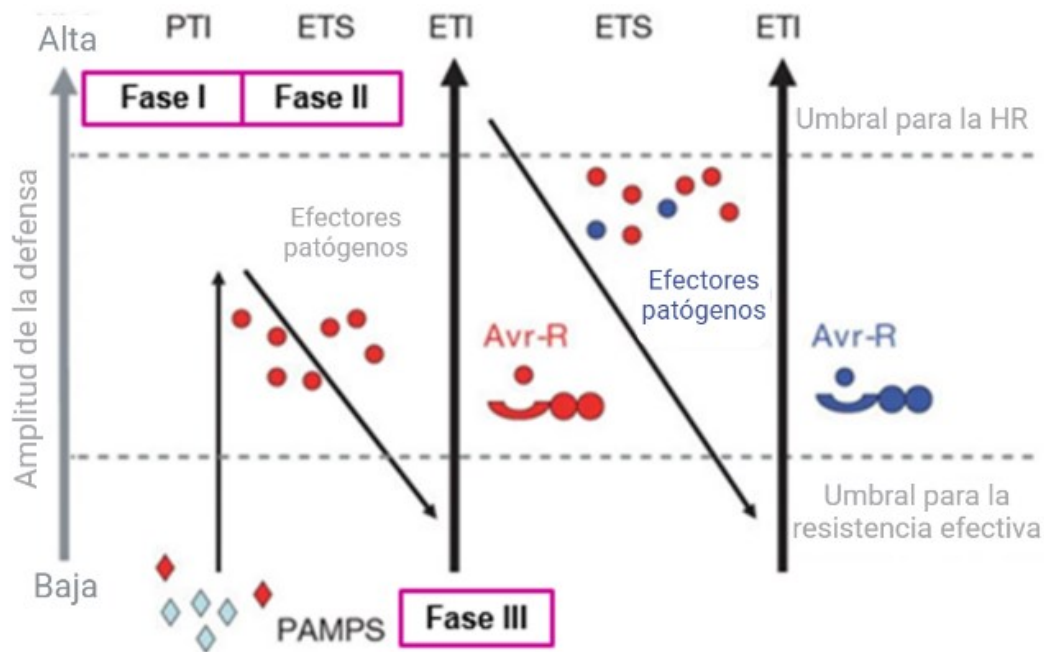
*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) es una bacteria gram-negativa hemibiotrofa que causa enfermedad en multitud de especies de interés agronómico, ocasionando grandes pérdidas económicas.

Existen diversas cepas de *Pseudomonas syringae* capaces de infectar a diferentes especies vegetales y algunos cultivares de la misma especie, siendo éste el criterio de clasificación de las cepas de *P. syringae* en patovares (pv.) (Gardan *et al.*, 1999). El patovar DC3000 se describió como patovar de tomate, aunque se ha demostrado que puede afectar a otras especies como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* (Wei y Collmer, 2018), permitiendo una mejor comprensión de los mecanismos moleculares (Xin y He, 2013).

Esta bacteria, junto a otras bacterias gram-negativas, contiene una isla de patogenicidad donde se encuentran los genes necesarios para causar la enfermedad (Alfano *et al.*, 2000). Según su función, esta isla puede clasificarse en tres grupos: (i) sistema regulador; (ii) sistema de secreción de tipo III (TTSS) y (iii): sustratos de TTSS (Collmer *et al.*, 2002).

Este patógeno coloniza mayoritariamente las partes aéreas de la planta, como las hojas y los frutos. El ciclo infeccioso se divide en dos etapas: la primera es la fase epífita, donde la bacteria vive en la planta, concretamente en la superficie del tejido vegetal; y la fase endofítica, donde vive en los espacios apoplásticos, causando la enfermedad en la planta (Xin *et al.*, 2018).

Las plantas inducen mecanismos defensivos frente a *Pseudomonas* dependiendo del tipo de reconocimiento, provocando el cambio de susceptibilidad a resistencia. Según el tipo de reconocimiento se distinguen dos vías de señalización: la vía conocida como PTI (*PAMP Triggered Immunity*), activada por el reconocimiento inespecífico de los PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y la vía activada por la percepción de los efectores, conocida como ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones y Dangl, 2006; Peng *et al.*, 2018) (Figura 1).



**Figura 1. Modelo en zig-zag del sistema inmune de las plantas.** En la fase I, la planta reconoce los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de los receptores reconocedores de patrones (PRRs), activándose la inmunidad PTI (PAMP Triggered Immunity). En la fase II, los patógenos liberan efectores que pueden interferir con la PTI, provocando la susceptibilidad desencadenada por el efector (Effector-Triggered Susceptibility, ETS). En la fase III, el factor de avirulencia (Avr) es reconocido por la proteína R de resistencia y se activa la inmunidad ETI (Effector-Triggered Immunity), provocándose la respuesta hipersensible (HR) y la muerte celular en el lugar de infección (Adaptación de Jones y Dangl, 2006 empleando BioRender).

#### La respuesta activada por PAMPs (PTI).

La primera fase de la respuesta defensiva de las plantas viene determinada por el reconocimiento de PAMPs por los PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), que son receptores de membrana específicos (Fase I; Figura 1).

Uno de los ejemplos a destacar es el reconocimiento de la flagelina bacteriana por el receptor transmembrana FLS2 (*flagellin-sensitive 2*) (Gómez-Gómez y Boller, 2000), mediante la unión directa con el epítipo inmunogénico flg22 de la bacteria *Pst*. Este receptor se expresa en las células epidérmicas, mesófilas y guarda, evitando la penetración masiva de bacteria en los tejidos por la activación de la respuesta defensiva temprana (Zeng y He, 2010).

Tras el reconocimiento se activa una cascada de transducción de señales dirigidas a suprimir la actividad bacteriana, provocando la inmunidad PTI mediante el cierre estomático, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la activación de proteínas de defensa PRs y cambios en la expresión génica (Zipfel *et al.*, 2004). Estas defensas suelen ser suficientes para evitar el desarrollo y crecimiento del patógeno en la planta (PTI; Figura 1).

## La respuesta activada por efectores (ETI).

Debido al proceso evolutivo, algunos patógenos han conseguido superar la primera barrera de respuesta defensiva de las plantas, conocida como PTI, mediante la producción de efectores o factores de avirulencia (*Avr*) que causan la ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*; Fase II, Figura 1). Las plantas se han adaptado y contrarrestan el ataque mediante la síntesis de proteínas de resistencia (*R*) que reconocen los efectores, estableciendo el segundo nivel defensivo (ETI; Fase III; Figura 1) (Jones y Dangl, 2006). Por lo general, las proteínas *R* contienen un dominio rico en leucinas (*Leucin-Rich Repeats*, LRR) y un sitio de unión a DNA (Narusaka *et al.*, 2009).

La interacción *R-Avr* se denomina interacción *gen-a-gen* (Flor, 1971). En este modelo se dan dos posibles interacciones entre la planta y el patógeno. Si la interacción es exitosa, tendrá lugar la resistencia a la enfermedad, conociéndose como interacción incompatible, que conllevará a la activación de ETI. En cambio, si no interaccionan el gen de resistencia con el factor de avirulencia, el patógeno se propagará por la planta y desencadenará la interacción compatible, provocando la enfermedad (Hurley *et al.*, 2014) por una infección sistémica y no necrotizante.

En el caso de incompatibilidad, se desencadenan cascadas de señalización que conducen a la muerte celular debido a la activación de la respuesta hipersensible (HR) en la zona infectada, que activará la resistencia sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR), que mantiene la defensa de la planta frente a posibles infecciones posteriores (Conrath, 2006). La interacción entre la variedad 'Río Grande', portadora del gen de resistencia *Pto*, y la bacteria *Pst*, que porta el gen de avirulencia *AvrPto* es uno de los sistemas de reconocimiento *gen-a-gen* más estudiados (Ronald *et al.*, 1992), donde se desencadena la ETI por el reconocimiento específico entre el factor codificado por el gen de resistencia y el efector *AvrPto*.

Estas cascadas de señalización consisten en el aumento de niveles de  $Ca^{2+}$ , la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la reprogramación transcripcional y la acumulación de SA libre. Además, en dichas cascadas de transducción de señal, que se inician por el reconocimiento *R-Avr*, participan MAPKs y factores de transcripción que se unen a elementos reguladores en el núcleo, provocando alteraciones a nivel proteómico y consiguiendo desarrollar la respuesta frente al patógeno. Por lo general, la respuesta elaborada contra el patógeno va acompañada de la acumulación de SA, proteínas PR y el consiguiente desarrollo de SAR, permitiendo una mayor resistencia frente a una posible segunda infección (Klessig *et al.*, 2018).

El SA es un compuesto fenólico simple clave en el establecimiento de la SAR, de manera que interviene en la activación de defensas de la planta (Klessig *et al.*, 2018). Esta hormona induce las proteínas PR y modula la respuesta defensiva que tiene lugar frente a patógenos biotrofos (Glazebrook, 2005). Con el fin de mejorar su solubilidad y disminuir su toxicidad, el SA sufre diferentes modificaciones que incluyen glicosilación, metilación, conjugación de aminoácidos o hidroxilación (Ding y Ding, 2020). En particular, la hidroxilación del SA para producir el ácido gentísico (GA) se lleva a cabo por el enzima S5H (Payá *et al.*, 2022). Ambos fenólicos se acumulan en tomate mayoritariamente en sus formas conjugadas a un azúcar tras una infección bacteriana. El SA también interacciona con hormonas como el ET o JA, siendo este último sintetizado para frenar el ataque de herbívoros y patógenos necrotrofos (Phuong *et al.*, 2020).

### 1.1.2. La respuesta defensiva de las plantas frente a insectos.

Del mismo modo que ocurre en la respuesta defensiva contra patógenos bióticos mediada por SA, la respuesta defensiva frente a insectos lleva consigo la activación de una ruta de transducción de señal en la que el JA juega un papel fundamental. Dicha cascada se activa por el daño mecánico

producido por el insecto y, en plantas de tomate, conduce a la síntesis final de los denominados inhibidores de proteasas digestivas de los insectos (PIN), que limitan su crecimiento y desarrollo (Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2013). Se ha descrito un *cross-talk* entre el SA y el JA de manera que la activación de la respuesta defensiva mediada por SA reprime la mediada por JA y viceversa (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Además, el estrés causado por herida conlleva a la activación del metabolismo de ROS a través del aumento en la oxidación de lípidos y proteínas (Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001), provocando un estrés oxidativo en la zona dañada o actuando como moléculas señalizadoras (Houmani *et al.*, 2018). Las especies reactivas de oxígeno son tóxicas en altas concentraciones y es por ello que las plantas han desarrollado un mecanismo antioxidante que involucra diferentes metabolitos y enzimas (Bela *et al.*, 2015), consiguiendo así reducir la toxicidad producida por ROS y protegiendo a las células.

El ácido jasmónico (JA) es una hormona implicada en el desarrollo de la planta y en la producción de compuestos químicos defensivos para conferir resistencia a un amplio espectro de organismos, desde patógenos microbianos hasta herbívoros vertebrados (Campos *et al.*, 2014). Además, esta hormona puede inducir la apertura estomática, inhibir la biosíntesis de la rubisco, afectar el transporte de materia orgánica (Ruan *et al.*, 2019), además de estar implicada en la respuesta frente a estreses abióticos.

La activación de la ruta de señalización mediada por JA activa la defensa sistémica (Schillmiller y Howe, 2005), produciéndose en primer lugar sistemina, péptido de 18 aminoácidos, que se unirá a su receptor quinasa en la membrana plasmática (Scheer y Ryan, 2002), para finalmente liberar ácido linoleico y producir jasmónico (Campos *et al.*, 2014) por acción de las lipoxigenasas (LOX).

El ácido jasmónico es fundamental en la resistencia de las plantas frente a patógenos necrotrofos e insectos herbívoros debido a que los jasmonatos son compuestos señalizadores que la planta sintetiza como respuesta a una lesión en el tejido, por ejemplo, por la acción de un insecto masticador. De este modo, se generan PIN que resultan tóxicos para el insecto (Howe y Jander, 2008). El daño producido por herida activa la respuesta mediada por JA y éste activa los PIN, que se acumulan en las hojas e interfieren con el sistema digestivo de los herbívoros, limitando así su crecimiento y desarrollo (Farmer *et al.*, 1992). Los PIN se clasifican en cuatro grupos dependiendo de la proteasa que inhiben: serina, cisteína, aspártico o metal proteinasas (Fan y Guo-Jiang, 2005). El grupo de las serín-proteasas se divide en dos familias: las familias de las subtilisina y la quimotripsina, incluyendo esta última enzimas digestivas como la elastasa, la tripsina y quimotripsina.

En nuestro laboratorio se describió que la proteína de tomate JIP-21 inducida por jasmónico (Jasmonic-induced protein 21, JIP21) e inicialmente propuesta como inhibidor de aspartil-proteasas, debería considerarse como un inhibidor de quimotripsina perteneciente al grupo de las serín-proteasas. Se observó que larvas de *Spodoptera littoralis*, cuyos enzimas digestivos son precisamente de tipo serín-proteasas, que fueron alimentadas con plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan JIP21 (*OE:TCI21*) sufrían un aumento de la mortalidad y retraso del crecimiento. De este modo se propuso denominar a esta proteína como inhibidor de quimotripsina 21 (TCI21) (Lisón *et al.*, 2006).

Además de interferir con el crecimiento y desarrollo de los insectos, existen estudios donde se sugiere la implicación de los PIN frente a bacterias patógenas para las plantas (Yang *et al.*, 2011; Turrà *et al.*, 2020). Por ello, nos planteamos estudiar la posible implicación de TCI21 en la respuesta

defensiva de plantas de tomate frente a *Pst*, mediante el uso de plantas transgénicas que sobreexpresan dicha proteína (*OE:TC121*).

## **1.2. Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs): biosíntesis y papel en la respuesta defensiva de la planta.**

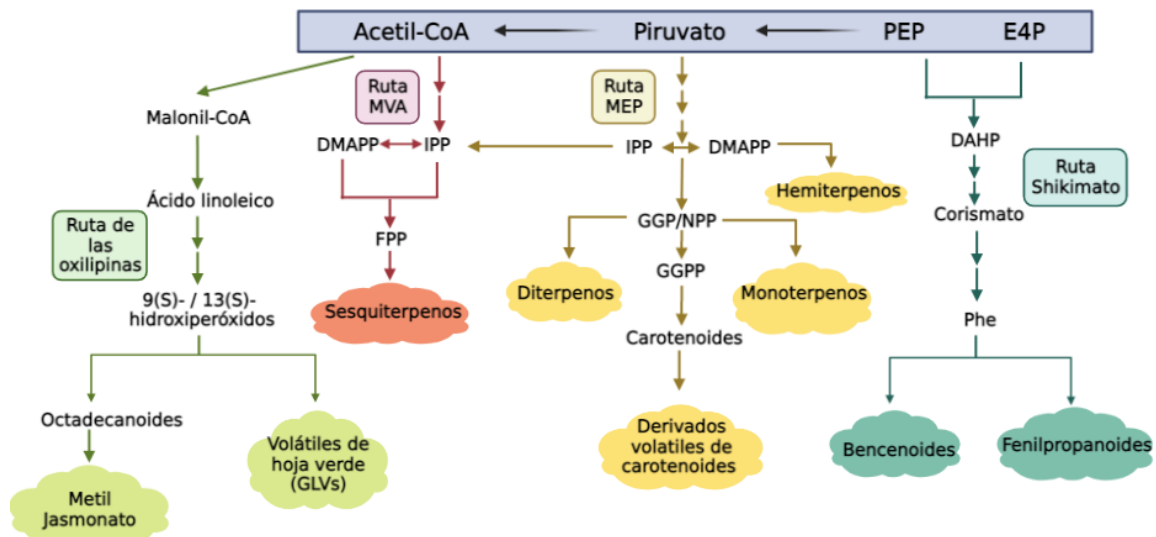
El metabolismo de la planta se puede dividir en metabolismo primario y secundario según sea esencial o no para su desarrollo. El metabolismo secundario no es esencial para el crecimiento de las plantas, pero es imprescindible y, por ello, se destinan una gran cantidad de recursos para sintetizar moléculas con el fin de, entre otros procesos, interferir con la infectividad de los patógenos.

Estos compuestos están involucrados en la interacción de la planta con su ambiente y poseen una gran variedad de funciones defensivas directas como, por ejemplo, antibióticas, insecticidas o herbicidas. Además, pueden actuar atrayendo y repeliendo animales, produciendo pigmentos que dan color a las flores y frutos para atraer a los agentes polinizadores y como compuestos protectores frente a predadores (sintetizando compuestos de sabor amargo e indigestos) (Buchanan *et al.*, 2002; Negre-Zakharov *et al.*, 2009). Asimismo, estos metabolitos pueden tener un papel defensivo indirecto, actuando como moléculas señal de la defensa de la planta.

La respuesta defensiva de las plantas incluye la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), que son líquidos lipofílicos de bajo peso molecular y una alta presión de vapor a temperatura ambiente que les permite atravesar las membranas celulares, liberándose al ambiente (Pichersky *et al.*, 2006). Estos metabolitos de naturaleza volátil, interaccionan con el entorno, atrayendo a polinizadores e incluso protegiendo frente a organismos patógenos (Dudareva *et al.*, 2013).

Estos compuestos son sintetizados por cuatro rutas que parten del metabolismo primario. La ruta empleada depende de la especie, el estado de desarrollo y el ambiente en el que se encuentra la planta (ul Hassan *et al.*, 2015). Las cuatro rutas son (Figura 2): (i) la ruta del shikimato/fenilalanina, de la que se obtienen los bencenoides y fenilpropanoides; (ii) la del metileritritol fosfato (MEP), cuyos productos son los monoterpenos, diterpenos, hemiterpenos y derivados de carotenoides; (iii) del ácido mevalónico (MVA), resultando en los sesquiterpenos; y (iv) de la lipoxigenasa (LOX) o ruta de las oxilipinas, obteniéndose los GLVs y metil jasmonato.





**Figura 2. Visión general de las rutas biosintéticas de compuestos orgánicos volátiles (VOCs).** Los VOCs se obtienen a partir de cuatro rutas que tienen como precursores productos del metabolismo primario de la planta (Acetil-CoA, piruvato, PEP y E4P). Las rutas principales son la ruta del shikimato/fenilalanina, la del metileritritol fosfato (MEP), la del ácido mevalónico (MVA) y de las oxilipinas. La representación de varias flechas seguidas indica que hay diferentes reacciones enzimáticas. (Figura adaptada de Dudareva et al., 2013 empleando BioRender).

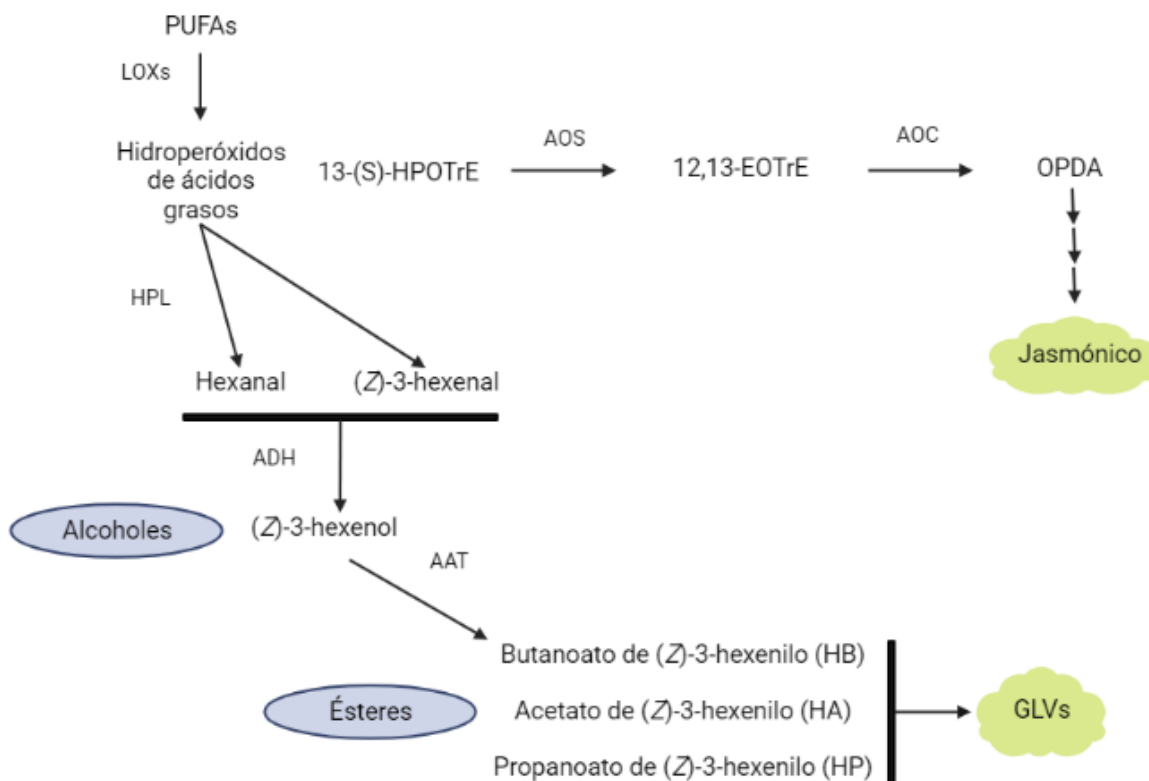
Generalmente la emisión de VOCs ha sido asociada a la respuesta defensiva de la planta frente a ataques de herbívoros. Aunque también se ha detectado su emisión tras infecciones patogénicas de hongos, bacteria o virus (Spinelli et al., 2010; Toome et al., 2010). Sin embargo, son pocos los estudios realizados hasta el momento describiendo la emisión de VOCs inducidos por bacterias (López-Gresa et al. 2017) y su implicación en la respuesta defensiva.

### 1.3. La ruta biosintética de las oxilipinas y su papel en la respuesta defensiva de la planta frente a bacteria.

Las oxilipinas se definen como una familia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) oxidados que están distribuidos en el reino animal y vegetal. Actúan como moléculas señalizadoras que contribuyen a la respuesta del sistema inmunitario de la planta modulando la interacción planta-patógeno (Fitoussi et al., 2021).

La ruta de las oxilipinas es una de las más estudiadas e importantes en cuanto a la activación de genes de defensa. Los PUFAs, ácido linoleico y linoléico, se incorporan a esta ruta mediante las lipasas, y las lipoxigenasas (LOXs) que actúan sobre ellos. En tomate se han descrito 6 genes *LOX* (*TomLoxA-F*) que codifican diversos tipos de lipoxigenasas (Chen et al., 2004). *TomLoxA*, *TomLoxB* y *TomLoxE* codifican 9-LOX y catalizan el primer paso de la síntesis de compuestos de 9 carbonos. Por su parte, *TomLoxC*, *TomLoxD* y *TomLoxF* se localizan en el cloroplasto, codifican lipoxigenasas de tipo 13-LOX y son las responsables de la síntesis de oxilipinas, tales como el ácido jasmónico y los GLVs. *TomLoxD* es la responsable de la emisión de JA tras una respuesta a herida y las líneas que sobreexpresan este gen son más resistentes a insectos y al hongo *Botrytis cinerea*, indicando que juega un papel importante en defensa (Yan et al., 2013). *TomLoxC* y *TomLoxF*, sin embargo, participan en la síntesis de los GLVs, y únicamente *TomLoxF* se induce como consecuencia de la infección producida por *Pseudomonas putida* (Mariutto et al., 2011) y durante el establecimiento de ETI (López-Gresa et al., 2017).

Las LOX producen hidroperóxidos, que son a su vez el sustrato común de diferentes enzimas como la aleno óxido sintasa (AOS), que da lugar a los jasmonatos (por ejemplo, el JA) o la hidroperóxido liasa (HPL), que convierte los hidroperóxidos en una amplia familia de compuestos volátiles de hoja verde (*Green Leaf Volátiles*; GLVs) (ul Hassan *et al.*, 2015) (Figura 3).



**Figura 3. Ruta de las oxilipinas o lipoxigenasas (LOX).** Tras la entrada del ácido linoleico y linolénico (PUFAs) en la ruta de las LOX, diferentes enzimas presentes en el diagrama actúan sobre los sustratos para formar los volátiles de hoja verde (*Green Leaf Volátiles*, GLVs) y jasmonatos. La representación de varias flechas seguidas indica que hay diferentes reacciones enzimáticas. (Elaboración propia empleando BioRender).

### 1.3.1. Volátiles de hoja verde (GLVs).

Los volátiles de hoja verde (GLVs) pertenecen a los VOCs y se producen a partir de la ruta LOX. Estos compuestos consisten en aldehídos de seis átomos de carbono, que pueden reducirse a sus correspondientes alcoholes por la acción de la alcohol deshidrogenasa (ADH) (Gigot *et al.*, 2010) y/o esterificarse a través de la alcohol acetiltransferasa (AAT) (D' Auria *et al.*, 2007). Estos GLVs se sintetizan normalmente en órganos verdes de la planta, como son las hojas (Dudareva *et al.*, 2013).

Se ha descrito que algunos de estos GLVs inhiben el crecimiento y propagación de patógenos de planta, como bacterias, virus y hongos. Además, se liberan frente a ciertos ataques de herbívoros y, dada su naturaleza volátil, actúan como mensajeros aéreos para que plantas vecinas puedan adaptarse a la futura amenaza (Croft *et al.*, 1993; Du *et al.*, 2011).

En nuestro laboratorio, mediante el análisis metabolómico de los VOCs implicados en la respuesta defensiva de plantas de tomate, se observó la emisión diferencial de ésteres de (Z)-3-hexenol, como el butanoato de (Z)-3 hexenilo (HB) y algunos monoterpenoides, como el  $\alpha$ -terpineol, 4-terpineol y el linalool al activarse la ETI tras una infección avirulenta por *Pst* (López-Gresa *et al.*, 2017). También

se ha comprobado el papel defensivo del HB, que actúa produciendo el cierre estomático, impidiendo la entrada de bacteria en la planta. Este compuesto ha sido patentado y licenciado debido a su enorme potencial en la agricultura (P201730685) (Payá *et al.*, 2020).

Por otra parte, en plantas de *Nicotiana attenuata* se ha demostrado que el silenciamiento de *HPL* produce una mayor respuesta mediada por JA, mientras que el silenciamiento de *AOS* amplificaba la respuesta mediada por GLVs (Halitschke *et al.*, 2004). Por ello, nos planteamos estudiar la ruta de las oxilipinas y confirmar la implicación de los GLVs en la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a *Pst*, mediante el uso de plantas obtenidas mediante CRISPR-Cas9 con un *knock-out* para el gen *AOS* (*CRISPR\_AOS12.1*).

### **1.3.2. Ruta biosintética del JA.**

La biosíntesis de JA tiene lugar a través de la ruta octadecenoica y, al igual que la ruta de biosíntesis de los GLVs, comienza con la liberación de ácido linolénico de las membranas plasmáticas de los cloroplastos y su posterior oxigenación a ácido 13-(S)-hidroxiperoxilínolénico (13-(S)-HPOTrE) por la acción de la LOX. Éste, a su vez, es oxidado y ciclado a ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) por la acción sucesiva de *AOS* y de una óxido de aleno ciclasa (AOC). Por último, el OPDA es trasladado a los peroxisomas donde es reducido y sometido a tres ciclos de beta-oxidación para originar el ácido jasmónico (Gfeller *et al.*, 2010).

El papel del JA en la respuesta defensiva ha sido clásicamente asociado a patógenos necrotrofos y herbívoros. Sin embargo, se ha descrito que la bacteria *Pseudomonas syringae* consigue activar las respuestas derivadas del ácido jasmónico mediante la síntesis de coronatina, que activa la señalización mediada por JA. De este modo se produce la apertura estomática y propagación bacteriana por la inhibición de la acumulación de ácido salicílico (SA), ya que reprime el gen *ICS1* y activa a *BSMT1*, involucrados en la biosíntesis y metabolismo de SA, respectivamente (Zheng *et al.*, 2012). Además, en estudios recientes se ha sugerido que la susceptibilidad de plantas de tomate a *P. syringae* se debe al *cross-talk* negativo entre el JA y el SA (Scalschi *et al.*, 2020). En nuestro laboratorio, se observó que el establecimiento de ETI en plantas de tomate infectadas con una cepa avirulenta de *Pst* lleva consigo la acumulación diferencial de JA (López-Gresa *et al.*, 2017).

## **2. OBJETIVOS**

La ruta de las oxilipinas tiene especial importancia en la respuesta defensiva de las plantas. A partir del hidroperóxido del ácido linolénico, sustrato común de la hidroperóxido liasa (HPL) y la aleno óxido sintasa (AOS), se sintetizan los volátiles de hoja verde (GLVs) y el ácido jasmónico (JA), respectivamente.

En nuestro laboratorio hemos observado la emisión diferencial de GLVs en plantas de tomate infectadas con una cepa avirulenta de la bacteria *Pst*, esto es, durante el establecimiento de ETI (López-Gresa *et al.*, 2017) y se ha demostrado su papel en la respuesta defensiva (López-Gresa *et al.*, 2018). Para profundizar en el estudio de su función defensiva, en nuestro laboratorio se han generado plantas de tomate *knock-out* para el gen *AOS* mediante la técnica CRISPR-Cas9 (*CRISPR\_AOS12.1*). La mutación de *AOS* produciría la redirección de los precursores de la ruta de las oxilipinas hacia la síntesis de GLVs, con la consiguiente reducción de los niveles de JA.

Por su parte, el JA se acumula en la planta en respuesta al ataque de insectos, patógenos necrotrofos y herida, dando lugar a la síntesis de inhibidores de proteasas que inhiben enzimas del tracto digestivo de insectos. En nuestro laboratorio, se ha descrito la acumulación de JA asociada a una

infección avirulenta con la bacteria *Pst* en plantas de tomate (López-Gresa *et al.*, 2017), desconociéndose el papel de esta oxilipina en este tipo de interacción. También en nuestro laboratorio se generaron plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan un PIN (*OE:TCI21*) inducible por JA (Lisón *et al.*, 2006), que podrían utilizarse para el estudio del papel defensivo del JA en la respuesta a *Pst*.

Por tanto, el objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado es el estudio del papel defensivo de la ruta de las oxilipinas en la interacción tomate-bacteria.

Para conseguir el objetivo principal, se pueden destacar dos objetivos específicos:

1. Estudio de la implicación de los GLVs en la resistencia frente a *Pst* mediante la caracterización fenotípica, química y molecular de plantas transgénicas de tomate *knock-out* para el gen *AOS* mediante CRISPR-Cas9 (*CRISPR\_AOS12.1*).
2. Elucidación del papel defensivo en la resistencia frente a *Pst* del inhibidor de proteasas TCI21 mediante:
  - 2.1 El estudio de su expresión diferencial en diferentes contextos defensivos.
  - 2.2 El estudio de la resistencia de plantas transgénicas que sobreexpresan TCI21 (*OE:TCI21*) frente a *Pst*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Material vegetal y microbiológico.**

Para llevar a cabo el Trabajo de Fin de Grado se emplearon plantas de tomate editadas en el gen *AOS* (*CRISPR\_AOS12.1*) y plantas de la variedad MoneyMaker (MM) como su fondo genético.

En un experimento paralelo se han utilizado plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan el inhibidor de proteasas TCI21 (*OE:TCI21*) (Lisón *et al.*, 2006) y plantas de la variedad Rutgers como parentales. Además, se han utilizado plantas de tomate de la variedad Rio Grande, portadoras del gen *Pto*.

La bacteria patógeno modelo que se utilizó como material microbiológico en el estudio de las plantas mencionadas anteriormente fue la cepa DC3000 de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), almacenada en glicerol a -80 °C.

##### **3.1.1. Germinación de semillas.**

Las semillas fueron esterilizadas en una mezcla de agua y lejía a partes iguales (1:1) durante 30 minutos, y posteriormente se eliminó la lejía mediante lavados sucesivos con agua estéril. Una vez esterilizadas se depositaron en placas Petri de 14 cm y 14 mL de agua destilada estéril para mantener la humedad necesaria, y permanecieron en la cámara de cultivo *in vitro* a 24 °C 3 días en condiciones de oscuridad y otros 3 en presencia de luz previamente a su cultivo.

##### **3.1.2. Condiciones de cultivo de las plantas en invernadero.**

Las plántulas se cultivaron en tierra para que obtuviesen el tamaño adecuado antes de la infección y recogida de muestra. Cada semilla germinada se colocó en macetas de 12 cm con mezcla de turba y vermiculita (1:1) como sustrato. Con el fin de optimizar el crecimiento de la planta las condiciones de invernadero fueron un fotoperiodo de día largo con 16 h de luz y 8 h de oscuridad, temperatura entre 20-26 °C y humedad relativa entre el 50-70 %. Además, se empleó solución nutritiva Hoagland para su riego.

### 3.2. Recogida de muestras.

Los foliolos de la tercera y cuarta hoja de cada planta fueron seleccionados para los análisis de compuestos fenólicos (HPLC), de expresión génica (RT-qPCR) y de crecimiento bacteriano (CFU; unidades formadoras de colonias). Las muestras recogidas se introdujeron en botes de polipropileno de 20 mL, se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido con el fin de evitar su degradación metabólica y se almacenaron en un congelador a -80 °C hasta su análisis.

### 3.3. Infecciones con *Pseudomonas syringae*.

#### 3.3.1. Preparación del inóculo.

El crecimiento de la bacteria se realizó en placas Petri con 25 mL de medio de cultivo LB agar (Tabla 1) suplementado con rifampicina (10 mg/mL) y kanamicina (100 mg/mL), y se incubó a 28 °C durante 48 h. Posteriormente, se seleccionó una colonia de la placa de LB agar y se sembró en 3 mL del medio de cultivo King B (Tabla 2) con rifampicina (10 mg/mL), en tubos Falcon de 50 mL y se mantuvo en una agitación de 200 rpm a 28 °C durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo, se observó la turbidez del medio causada por el crecimiento de *Pst*, y se pasó 1 mL a 12 tubos Falcon con 14 mL de King B líquido y se mantuvo 24 h a 28 °C en agitación para mejorar el crecimiento bacteriano.

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

COMPUESTO	CANTIDAD (1L)
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 (1L)
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

Para ajustar la dosis, se centrifugó el cultivo bacteriano durante 15 min a 3000 rpm, se disolvió el sedimento en 20 mL de MgCl<sub>2</sub> 10 mM estéril y se midió la absorbancia a 600nm con un espectrofotómetro (Pharmacia), hasta ajustarla a una densidad óptica (D.O.) de 0,1, que corresponde con una concentración de 5x10<sup>7</sup> unidades formadoras de colonias (CFU)/mL.

#### 3.3.2. Infección.

Una vez preparada la suspensión bacteriana, se le añadió un 0,05 % de Silwet L-77 para favorecer la penetración de la bacteria y se procedió a la infección de las plantas de tomate de 21-28 días. Para ello se empleó el método de inmersión debido a que se asemeja al proceso de infección natural de *Pst* sumergiendo las plantas en la suspensión bacteriana durante 30 s. Además, se emplearon plantas sin infectar (mock) que se sumergieron en una disolución de MgCl<sub>2</sub> 10mM estéril con 0,05 % de Silwet L-77, es decir, una disolución igual a la anterior, pero carente de bacterias.

### 3.3.3. Conteo bacteriano.

Pasadas 24 h tras la infección (hpi), se continuó con la recogida de muestras y el conteo bacteriano. Para ello, se tomaron 3 discos de 1 cm<sup>2</sup> de foliolos diferentes de la tercera y cuarta hoja de una misma planta con un sacabocados, y se introdujeron en eppendorfs con 300 µL de MgCl<sub>2</sub> estéril 10 mM. Posteriormente, se trituraron los 3 discos en los eppendorfs con 5 bolas de vidrio con el homogeneizador TissueLyser II (Qiagen) con una frecuencia de 30 s<sup>-1</sup>.

Una vez homogeneizado el tejido se añadieron 700 µL de MgCl<sub>2</sub> 10 mM y se terminó de homogeneizar con un vortex.

Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas 1:10 en placas Elisa de 96 pocillos, llegando a la dilución 10<sup>-5</sup>, y se sembraron 100 µL de 3 diluciones por cada planta (10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-3</sup>) en placas Petri con 25 mL de King B agar (Tabla 3) ayudándonos de bolas de vidrio para su correcto reparto en el medio. Las placas se mantuvieron a 28 °C durante 48 h. Transcurrido este tiempo se seleccionó la dilución que tuviera entre 30-300 colonias para realizar el conteo con la ayuda de la lupa contenida en el contador de colonias (Selecta; Vidrafoc).

Finalmente, con el número de colonias se calculó el número CFU/cm<sup>2</sup> y el logaritmo en base 10 de las CFU (Ecuación 1).

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

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

**Ecuación 1.** Logaritmo en base 10 de CFU/cm<sup>2</sup>.

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

### 3.4. Medida de la expresión de transcritos mediante RT-qPCR.

#### 3.4.1. Extracción y cuantificación de RNA.

Para realizar la extracción de RNA de hojas de tomate se partió del tejido congelado y homogeneizado conservado en el congelador a -80 °C. La extracción se llevó a cabo en frío utilizando el kit de extracción Nucleospin® RNA Plant (MACHEREY-NAGEL) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Se utilizó un espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop® ND-1000 calibrado con un blanco de agua libre RNAsas (proporcionado en el kit de extracción de RNA) para cuantificar el RNA extraído de cada muestra. Se obtuvieron los datos de concentración (ng/µL) de cada una de las muestras midiendo la absorbancia a 260 nm. En la medida realizada por el equipo también se garantizó la calidad del RNA, comprobando los ratios de absorbancia medidos a diferentes longitudes de onda A<sub>260/280</sub> y A<sub>260/230</sub>, y todos los análisis del RNA presentaron valores entre 1,8 y 2,0.

#### 3.4.2. Retrotranscripción.

Una vez extraído y cuantificado el RNA, se empleó el kit comercial PrimeScript™ RT Reagent Kit (perfect Real Time) de Takara para realizar el proceso de retrotranscripción y obtener el cDNA

siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. La reacción contenía 2 µL de tampón (5x PrimeScript Buffer), 1 µg de RNA, 0,5 µL de oligoDT Primer 50 µM, 0,5 µL de enzima retrotranscriptasa (PrimeScript RT enzymeMix I) y H<sub>2</sub>O DEPC hasta alcanzar un volumen final de 10 µL. Las muestras se incubaron 15 minutos a 37 °C y seguidamente, 15 segundos a 85 °C para inactivar la enzima.

Una vez inactivada la enzima, las muestras se mantuvieron en hielo y se diluyeron con H<sub>2</sub>O DEPC hasta obtener un volumen final de 100 µL. Finalmente, las muestras de cDNA se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

### 3.4.3. Amplificación cuantitativa de cDNA.

Para realizar esta técnica se empleó el reactivo de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y se siguieron las proporciones de SYBR, agua Mili-Q, cDNA y cebadores indicados por el fabricante.

Se utilizaron placas de 96 pocillos MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate (Applied Biosystems) con un volumen final de 10 µL, se selló la placa y se dio un *spin* para eliminar posibles burbujas. Las secuencias de oligonucleótidos empleados se recogen en la Tabla 4. En todas las RT-qPCR realizadas se utilizó la actina como gen de control interno y se realizaron 3 repeticiones técnicas de cada réplica biológica de cDNA.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos empleados como cebadores en los experimentos de RT-qPCRs.

Gen	Cebador directo (5'-3')	Cebador reverso (5'-3')
<i>AAT1</i>	TTGCCTGTATGGGAAAGACA	AGATTCCCACGCAATTTTTG
<i>Actina</i>	CTAGGCTGGGTTTCGCAGGAGATGATGC	GTCTTTTTGACCCATACCCACCATCACAC
<i>HPL</i>	AGCTACGGATTGCCGTTAGT	CCATTCTCTTGGTGAAGAA
<i>PR1</i>	ACTCAAGTAGTCTGGCGCAACTCA	AGTAAGGACGTTGTCCGATCGAGT
<i>S5H</i>	GGGATGTCCCGGAAGTAAGT	GGCATTGGATGGGATATTCA
<i>TCI21</i>	ACTCGTCCTGTGCTTTGTCC	CCCAAGAGGATTTTCGTTGA
<i>TomLoxF</i>	CCGAATCAAAGGGTGACTTT	GGTCTGTGATGATCGATTGC

### 3.5. Análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

El análisis de VOCs se realizó introduciendo en un vial de 7 mL, en presencia de nitrógeno líquido, 100 mg de hoja de tomate homogeneizada y congelada pesada en balanza de precisión. Posteriormente, a cada vial se le añadió 1 mL de disolución de CaCl<sub>2</sub> saturada y 100 µl de EDTA 750 mM a pH 7.5, y una vez cerrado herméticamente se agitó mediante ultrasonidos 5 minutos.

La técnica empleada para la extracción de los VOCs fue *Head Space Solid-Phase Microextraction* (HS-SPME) empleando el automuestreador CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Suiza) (López-Gresa *et al.*, 2017). Este método consiste en la incubación de muestras a 50 °C durante 10 minutos. El proceso de extracción se llevó a cabo durante 20 minutos a 50 °C empleando una fibra PDMS/DVB (Supelco, Bellefonte, PA, USA). El proceso de desorción de los compuestos adheridos a la superficie de la fibra tuvo lugar durante 1 minuto a 250 °C.

Los VOCs se analizaron con el cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Santa Clara, CA, USA), acoplado con el detector de masas de impacto electrónico (IE) Agilent 5975B Inert XL, con una energía de ionización de 70 eV y temperatura de fuente de 230 °C. La temperatura del horno fue 40 °C durante 2 minutos seguida de un aumento gradual de 5 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 250 °C. Se utilizó el helio como gas portador a un flujo constante de 1,2 mL/min. Los datos se recopilaron mediante 6 scans/s en el rango  $m/z$  de 35-250, y se utilizó el software *MassHunter Quantitative Analysis* (Agilent) para adquirir y procesar los cromatogramas y espectros. La identificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo por comparación de los espectros de masas obtenidos con la librería NIST proporcionada por el cromatógrafo y del tiempo de los estándares suministrados por el servicio de Metabolómica del IBMCP.

### **3.6. Análisis de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).**

En Eppendorfs de 2 mL de volumen se pesaron 500 mg de tejido almacenado a -80 °C y se homogeneizó en 1,5 mL de metanol con ácido orto-anísico (OA), utilizado como patrón interno a una concentración de 0,025 mM. Posteriormente, las muestras se agitaron mediante ultrasonidos 10 minutos para la disgregación del tejido.

Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm a 4 °C durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un vial de vidrio de 4 mL. El pellet se resuspendió en 500 µL de metanol suplementado con 0,025 mM de OA para agotar la extracción y se volvió a centrifugar. El sobrenadante resultante se adicionó al obtenido anteriormente y se separaron en dos nuevos viales, uno para la extracción de compuestos fenólicos libres y otro para totales (1mL por vial). Finalmente, se empleó una corriente de N<sub>2</sub> seco a 37 °C para evaporar por completo el metanol de los viales.

Para medir los compuestos fenólicos totales, libres y glicosilados contenidos en las muestras, se empleó la enzima β-glucosidasa, que actúa hidrolizando el enlace entre el azúcar y el compuesto fenólico, obteniéndose el contenido total del mismo en la fase orgánica. De este modo, se resuspendieron las muestras secas totales en 900 µL de acetato de sodio 0,1 M a pH 4.5 y se añadió 100 µL de β-glucosidasa (Fluka) preparada a 10 mg/mL en acetato de sodio 0,1 M a pH 4.5 y se dejó en el termobloque a 37 °C toda la noche.

En cuanto a los compuestos fenólicos libres, las muestras se resuspendieron en 1 mL de acetato de sodio 0,1 M a pH 4.5 y se dejaron incubar toda la noche en las mismas condiciones.

Tras el tiempo de incubación, se añadieron a todos los viales (libres y totales) 77 µL de ácido perclórico al 70 % para detener la reacción enzimática por acidificación y permitir una mejor separación de las fases. Posteriormente, se añadieron 2,5 mL de ciclopentano-acetato de etilo (1:1), se agitó en vortex y se dejó en reposo hasta la formación de las dos fases. La fase orgánica se transfirió a viales nuevos y se evaporó hasta secado total bajo corriente de N<sub>2</sub> a 37 °C. Finalmente, se resuspendieron las muestras en 300 µL de metanol y se filtraron con una jeringa de 1 mL con filtro milipore de nylon (Waters).

Se siguió el protocolo de uso del equipo de HPLC descrito por Bellés *et al.*, (1999). Se transfirieron 100 µL del extracto a viales específicos para analizar en el HPLC (Accuform PP vial 0,7 mL, Thermo Scientific), y se inyectaron 30 µL en la columna de fase reversa Sunfire C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm; Waters, Mildford, MA) equilibrada con ácido acético al 1 %. Se detectaron SA, GA y OA empleando una longitud de onda de excitación de 313 nm y de emisión de 405 nm con el detector de fluorescencia Waters 2475.



Con el fin de cuantificar el SA, OA y GA , se elaboraron curvas patrón con distintas muestras a concentraciones conocidas.

### 3.7. Análisis estadísticos.

Se utilizaron diferentes métodos de análisis estadísticos. Para comparar dos grupos de muestras se realizó un análisis *t* de Student mientras que, en el caso de ser más de dos grupos, un análisis de la varianza (ANOVA), empleando dichas herramientas que están disponibles en GraphPad. Además, en ambos casos, para considerar que un resultado era significativo se empleó como umbral un *p*-value menor de 0,05.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

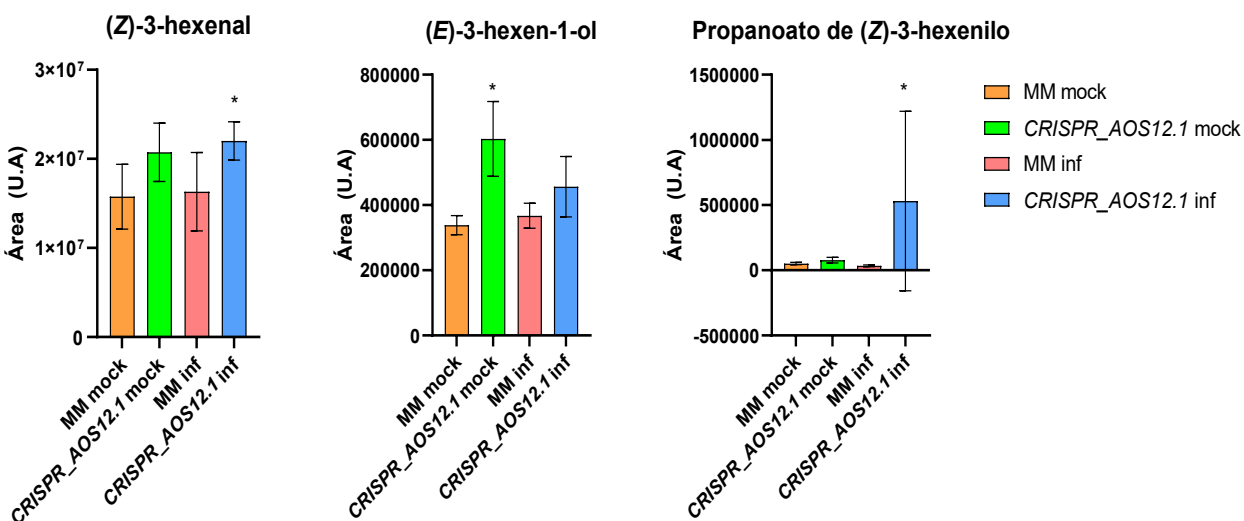
### 4.1. Implicación de los GLVs en la resistencia frente a *Pst*.

Los volátiles de hoja verde (GLVs) se sintetizan a través de la ruta de las oxilipinas, donde los hidroperóxidos son el sustrato común de la aleno óxido sintasa (AOS) y de la hidroperóxido liasa (HPL), que dan lugar a los jamonatos y GLVs, respectivamente (ul Hassan *et al.*, 2015).

En el presente trabajo se han utilizado plantas de tomate *knock-out* para el gen AOS generadas mediante CRISPR-Cas9 (*CRISPR\_AOS12.1*) en la variedad 'MoneyMaker' (MM). Al mutar dicho gen, se espera una redirección del flujo metabólico hacia la síntesis de GLVs y una reducción en los niveles de jasmonatos.

Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha observado que el establecimiento de ETI en plantas de tomate infectadas con *Pst* lleva consigo la emisión de ésteres de (Z)-3-hexenol, incluyendo el butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB), así como monoterpenoides como el  $\alpha$ -terpineol, 4-terpineol y el linalool (López-Gresa *et al.*, 2017). Además, se ha comprobado que algunos GLVs, como el (E)-2-hexenal y acetato de (Z)-3-hexenilo presentan actividad antibiótica en plantas de tomate frente a *Pst* y pueden considerarse como metabolitos defensivos directos (Payá, 2017). Asimismo, se ha demostrado el papel defensivo del HB frente a *Pst* tanto en condiciones de invernadero como de campo (López-Gresa *et al.*, 2018; Payá *et al.*, *under review*). Por tanto, el objetivo principal de la generación de estas plantas mutantes es aumentar los niveles de GLVs y, por consiguiente, aumentar la resistencia de las plantas frente a infecciones por *Pst*.

Para comprobar si la mutación de AOS provocaba un cambio en los niveles de emisión de GLVs se infectaron las plantas *CRISPR\_AOS12.1* y su parental y 24h después de la infección se midieron los niveles de GLVs (ver figura completa en Anexos; Figura 1S). En la Figura 4 podemos observar que los niveles de algunos GLVs, tales como el (Z)-3-hexenal, el (E)-3-hexen-1-ol y el propanoato de (Z)-3-hexenilo, mostraron una tendencia al aumento en las plantas *CRISPR\_AOS12.1* en relación con las MM en plantas no infectadas (mock), siendo los resultados para el (E)-3-hexen-1-ol estadísticamente significativos. Por otra parte, la emisión tanto de la forma aldehídica como la esterificada fue significativamente mayor 24 horas después de la inoculación con *Pst* (inf) en las plantas *CRISPR\_AOS12.1* con respecto a sus correspondientes parentales MM.



**Figura 4. Análisis de la emisión de VOCs en plantas tomate mutadas en AOS (CRISPR\_AOS12.1) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con *Pst* (inf).** Cuantificación relativa en unidades arbitrarias (UA) de los niveles de (Z)-3-Hexenal, (E)-3-hexen-1-ol y propanoato de (Z)-3-hexenilo. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento. El (\*) asterisco simple indica que existe significación estadística entre las plantas mutadas respecto a su parental en la misma condición con un  $p$ -value < 0,05.

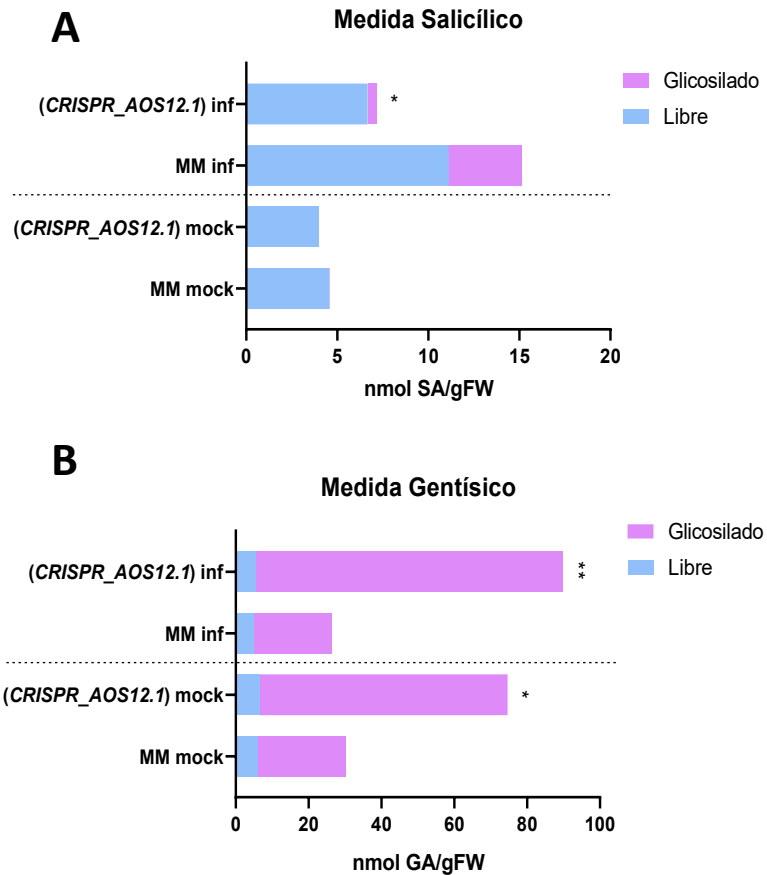
De este modo, se observa que, tal y como cabía esperar, las plantas mutadas en AOS tienen un mayor nivel de emisión GLVs, confirmando que existe un *cross-talk* metabólico entre ambas cascadas de oxilipinas (JA-GLVs), posiblemente causado por la limitación de sustrato. Resultados similares se han descrito en plantas de *Nicotiana attenuata*, donde se observó que el silenciamiento de AOS y de HPL da lugar a una menor producción de JA y GLVs, respectivamente (Halitschke *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que en *Zea mays* hay una mayor producción de (Z)-3-hexenal en respuesta al daño mecánico y al causado por herbívoros (Yactayo-Chang *et al.*, 2022).

Por tanto, una vez confirmada la mayor emisión de estos GLVs en *CRISPR\_AOS12.1*, nos planteamos el estudio de diferentes aspectos de la respuesta defensiva tales como la acumulación de SA y la resistencia frente a *Pst*.

#### 4.1.1. Estudio de los niveles de acumulación de SA y GA en plantas *CRISPR\_AOS12.1*.

El SA juega un papel clave en la activación de la respuesta defensiva frente a patógenos biotrofos. Tanto el SA, como su derivado metabólico GA, se acumulan en la planta conjugados a azúcares de glucosa y xilosa, respectivamente tras la infección con un patógeno biotrofo (Bellés *et al.*, 1999). El JA es un compuesto antagonista del SA, que actúa inhibiendo la acumulación de SA debido a la supresión del gen *ICS1* y la activación de la degradación por *BSMT1*, que están involucrados en la biosíntesis y el catabolismo de SA, respectivamente (Zheng *et al.*, 2012). De este modo, puesto que las plantas *CRISPR\_AOS12.1* presentan una mutación en el gen AOS, involucrado en la síntesis de jasmonatos, nos planteamos el estudio de los niveles de acumulación de SA, ya que podrían estar afectados por la probable menor acumulación de JA.

Para comprobarlo, se analizaron los niveles de SA (Figura 5A) y GA (Figura 5B) mediante HPLC, tanto en su forma libre como en la glicosilada tras 24 horas de la infección con *Pst* (inf) y en la situación basal (mock) (ver Materiales y Métodos).



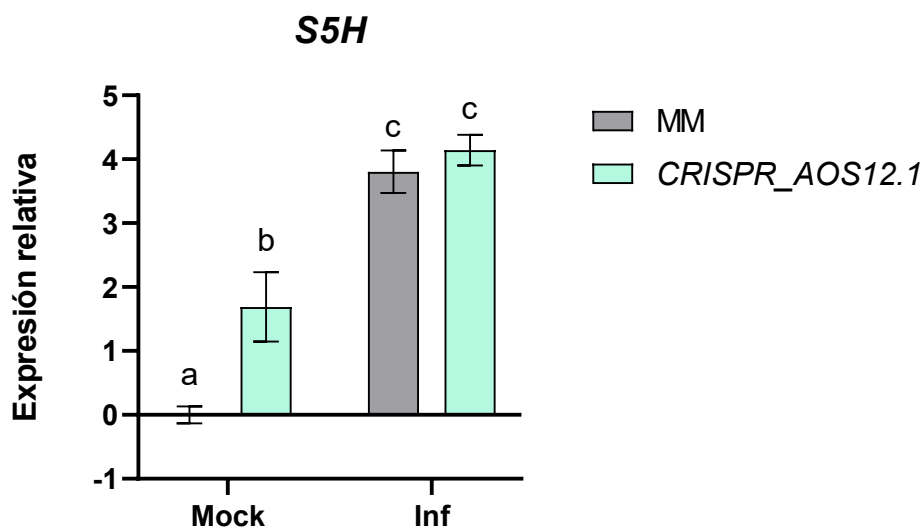
**Figura 5. Medidas de los niveles de SA (A) y GA (B) en plantas de tomate mutadas en AOS (CRISPR\_AOS12.1) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con Pst (inf).** Se representan los niveles totales como libre y glicosilados. Los resultados se corresponden con el promedio de 4 plantas independientes de un experimento. Los resultados se encuentran separados entre condiciones mock e inf por una línea discontinua, indicando que se ha realizado un t de Student comparando las plantas mutadas con las parentales de su misma condición. El simple (\*) y doble (\*\*) asterisco indican que existe significación estadística con un p-value < 0,05 y p-value < 0,005, respectivamente.

En la Figura 5A, se observa que no se existen diferencias en los niveles de SA entre las plantas CRISPR\_AOS12.1 y sus parentales MM sin infectar. Sin embargo, los niveles de acumulación de SA en las plantas CRISPR\_AOS12.1 infectadas son significativamente menores que en el caso de MM infectadas.

La Figura 5B muestra una acumulación diferencial del GA en las plantas CRISPR\_AOS12.1. Se observa que las plantas CRISPR\_AOS12.1 presentan niveles de GA significativamente mayores tanto en condiciones basales y como tras la infección, comparándolos con sus parentales.

El GA se ha demostrado que también está involucrado en la activación de las respuestas de defensa en plantas de tomate frente a patógenos y se acumula en su forma glicosilada proporcionando resistencia. Tratamientos exógenos con GA provocan activación de las proteínas de resistencia (Bellés *et al.*, 1999; Tárraga *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2014). De este modo, considerando el aumento de GLVs y de GA en las plantas mutadas en el gen AOS, se espera que estas plantas presenten resistencia frente a *Pst*.

El SA es hidroxilado por la acción de S5H, produciendo GA, que se acumula en plantas infectadas con distintos patógenos (Bellés *et al.*, 1999; López-Gresa *et al.*, 2016; López-Gresa *et al.*, 2017; Payá *et al.*, 2022). Por tanto, se decidió estudiar su expresión en estas plantas (Figura 6) con la finalidad de comprender los niveles de SA y GA analizados en esta interacción patogénica.



**Figura 6. Nivel de expresión del gen S5H en plantas de tomate mutadas en AOS (CRISPR\_AOS12.1) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con *Pst* (inf).** Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con los valores de expresión del gen endógeno Actina. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento. Letras diferentes indican la existencia de diferencia significativa entre plantas mutadas y su parental y la situación basal e infección, con un  $p$ -value  $< 0,05$ .

La Figura 6 muestra un aumento significativo de la expresión basal de S5H en las plantas CRISPR\_AOS12.1 no infectadas en comparación con sus correspondientes parentales MM sin infectar. Asimismo, tras la infección, se observa un aumento de la expresión de S5H en comparación con la condición mock, siendo las diferencias entre las plantas infectadas CRISPR\_AOS12.1 y MM no significativas.

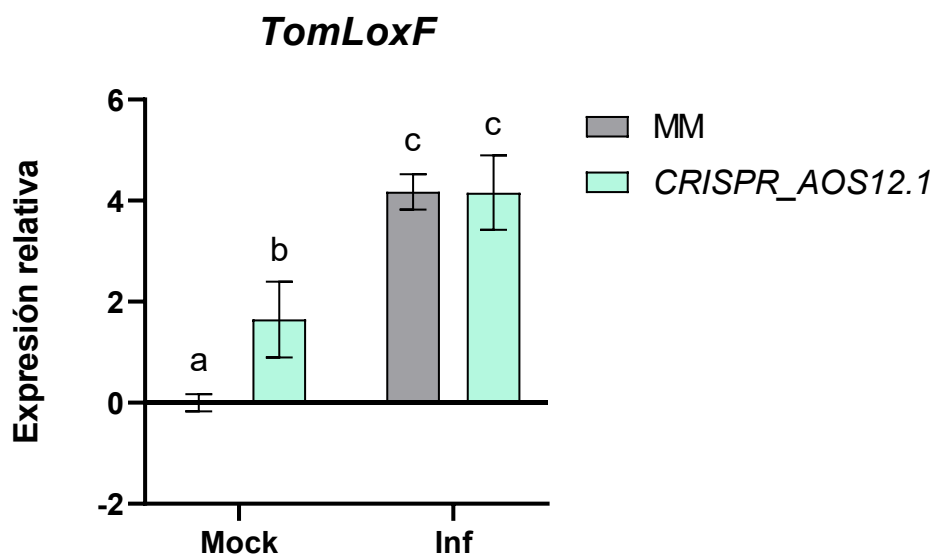
Los niveles elevados de SA resultan tóxicos para la planta, por lo que su catabolismo cobra gran importancia. La enzima S5H hidroxila en posición 5 al SA produciendo GA. Los resultados presentes en la Figura 6, en los que globalmente se observa una tendencia a una mayor expresión de S5H en las plantas CRISPR\_AOS12.1 podrían explicar los niveles de SA y GA (Figura 5A y 5B). Así, mientras que los niveles de GA serían significativamente mayores en las plantas CRISPR\_AOS12.1, los de SA tenderían a ser menores por su conversión a GA por parte de S5H. La correlación entre los niveles

de *S5H* y *GA* ha sido previamente descrita en nuestro grupo (Payá *et al.*, 2022). Por tanto, la acumulación de *GA* por acción de *S5H* podría apoyar la hipótesis planteada del aumento en la resistencia de plantas *CRISPR\_AOS12.1*.

#### 4.1.2. Análisis de expresión de *TomLoxF*, *HPL* y *AAT1*.

En la ruta de las oxilipinas, las lipoxigenasas (LOXs) actúan sobre los PUFAs, dando lugar a los hidroperóxidos, que van a ser el sustrato de *AOS* o *HPL*, produciendo jasmonatos o GLVs, respectivamente (ul Hassan *et al.*, 2015). Los aldehídos resultantes de la acción de *HPL* serán reducidos a alcoholes por la *ADH* y finalmente, la *AAT* esterificará los alcoholes (Fauconnier *et al.*, 1999; D'Auria *et al.*, 2007). De las 6 LOX descritas en tomate, se ha observado que *TomLoxF* se induce como consecuencia de la infección producida por *Pseudomonas putida* (Mariutto *et al.*, 2011) y durante el establecimiento de ETI causada por *Pst* (López-Gresa *et al.*, 2017), participando en la síntesis de GLVs.

Así pues, con el fin de estudiar los genes que participan en la síntesis de GLVs en las plantas *CRISPR\_AOS12.1*, en las que se pretende redireccionar los hidroperóxidos hacia la síntesis de estos volátiles, se realizaron estudios del análisis de expresión de *TomLoxF* (Figura 7), *HPL* (Figura 8) y *AAT1* (Figura 9), en dichas plantas.

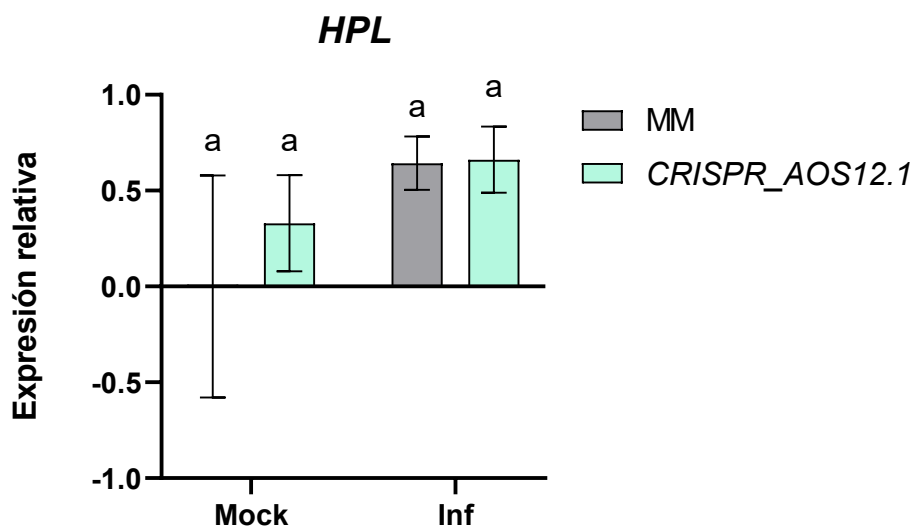


**Figura 7. Nivel de expresión del gen *TomLoxF* en plantas de tomate mutadas en *AOS* (*CRISPR\_AOS12.1*) y su parental *MM* sin infectar (*mock*) y 24 h después de la inoculación con *Pst* (*inf*). Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con los valores de expresión del gen endógeno *Actina*. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento. Letras diferentes indican la existencia de diferencia significativa entre plantas mutadas y su parental y la situación basal e infección, con un  $p$ -value  $< 0,05$ .**

Como podemos ver en la Figura 7, las plantas *CRISPR\_AOS12.1* sin infectar presentaron unos niveles de *TomLoxF* significativamente superiores a los presentados por su correspondiente parental sin infectar. Asimismo, se confirmó la inducción de este gen por *Pst*, no observándose diferencias significativas en las plantas *CRISPR\_AOS12.1* infectadas al compararlas con las *MM* infectadas.

Los mayores niveles de expresión relativa de *TomLoxF* en las plantas *CRISPR\_AOS12.1* sin infectar confirman la propuesta de un *cross-talk* metabólico entre la ruta de JA y los GLVs, ya que la mutación en *AOS* conllevaría una menor competencia de los hidroperóxidos para formar JA, que se redireccionarían para formar GLVs, aumentando así la expresión de genes para su biosíntesis tales como *TomLoxF*.

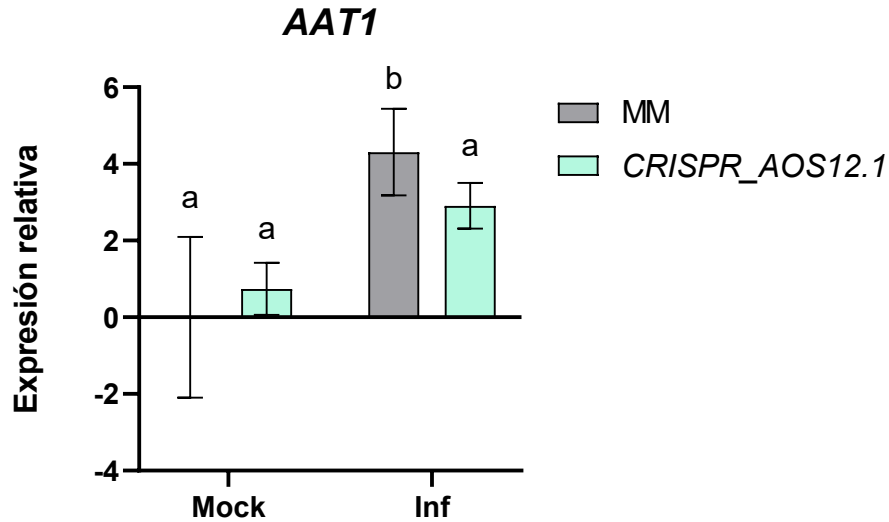
Como se ha comentado anteriormente, los hidroperóxidos pueden dar lugar a la producción de GLVs a través de HPL o de jasmonatos mediante AOS. HPL genera el corte del linolénico para producir GLVs de 6 átomos de carbono como el (Z)-3-hexenal, que está involucrado directamente en la resistencia frente a insectos succionadores (Feussner y Wasternack, 2002) y otros como el (E)-2-hexenal y acetato de (Z)-3-hexenilo que podrían considerarse metabolitos defensivos directos frente a *Pst* (Payá, 2017). Nuestra hipótesis es que las plantas *CRISPR\_AOS12.1* podrían presentar una mayor inducción del gen *HPL* que su fondo genético MM y para comprobarlo se prosiguió con su análisis de expresión (Figura 8).



**Figura 8. Nivel de expresión del gen HPL en plantas de tomate mutadas en AOS (*CRISPR\_AOS12.1*) y su parental MM sin infectar (*mock*) y 24 h después de la inoculación con *Pst* (*inf*). Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con los valores de expresión del gen endógeno *Actina*. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre plantas mutadas y su parental y la situación basal e infección, es decir, con un *p-value* > 0,05.**

Sorprendentemente, tras analizar la expresión relativa de dicho gen, se puede observar en la Figura 8 que no hay diferencias significativas, ni siquiera como consecuencia de la infección por *Pst*. Esto podría deberse a que el enzima no es limitante, es decir, que con poca cantidad de HPL basta para suplir la respuesta necesaria en la planta y no haría falta una inducción de su expresión, o bien que está regulado por otros factores post-traduccionales.

Como se ha citado anteriormente, AAT está implicado en la esterificación de los alcoholes producidos por ADH. Por ello, para estudiar los genes implicados en la síntesis de GLVs se prosiguió con el análisis de expresión de *AAT1* (Figura 9).

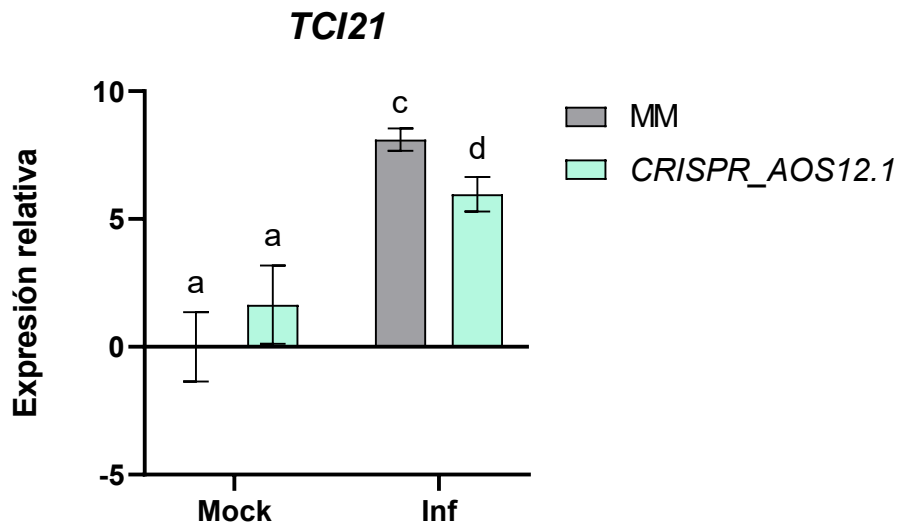


**Figura 9.** Nivel de expresión del gen *AAT1* en plantas de tomate mutadas en AOS (*CRISPR\_AOS12.1*) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con *Pst* (inf). Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con los valores de expresión del gen endógeno Actina. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento. Letras diferentes indican la existencia de diferencia significativa entre plantas mutadas y su parental y la situación basal e infección, con un *p*-value < 0,05.

En la Figura 9 se representa el análisis de expresión del gen *AAT1* en plantas control (MM) y mutantes (*CRISPR\_AOS12.1*) en condiciones de infección (Inf) y no infección (Mock). No se observaron diferencias significativas en los niveles basales de *AAT1* en las plantas *CRISPR\_AOS12.1* con respecto a sus parentales en plantas sin infectar. Por otra parte, se observó que tras la infección se produce una inducción significativa de la expresión de *AAT1* en MM, pero no en *CRISPR\_AOS12.1*. Nuestros resultados contrastan con los esperados, puesto que la redirección de los sustratos para la síntesis de GLVs debería suponer un mayor nivel de expresión de *AAT1* en *CRISPR\_AOS12.1*. No obstante, *AAT* es una enzima al final de la ruta de síntesis de los GLVs en la ruta de las oxilipinas, por lo que puede que los efectos del *knock-out* no sean apreciables. Alternativamente podría ocurrir que una mayor resistencia de las plantas *CRISPR\_AOS12.1* requiriera de una menor activación de la ruta de biosíntesis de GLVs tras la infección y por ello, una menor activación transcripcional de los genes implicados en su biosíntesis.

#### 4.1.3. Señalización mediada por JA y SA en plantas *CRISPR\_AOS12.1*.

Los inhibidores de proteasas, entre los que se encuentran TCI21 (Lisón *et al.*, 2006), se activan por la respuesta mediada por JA ante la herida ocasionada por herbívoros, limitando el crecimiento de estos (Farmer *et al.*, 1992). Con el fin de estudiar las alteraciones de la respuesta mediada por JA en las plantas con el *knock-out* en AOS, supuestamente incapaces de sintetizar jasmonatos, se estudió el nivel de expresión del gen *TCI21* (Figura 10).

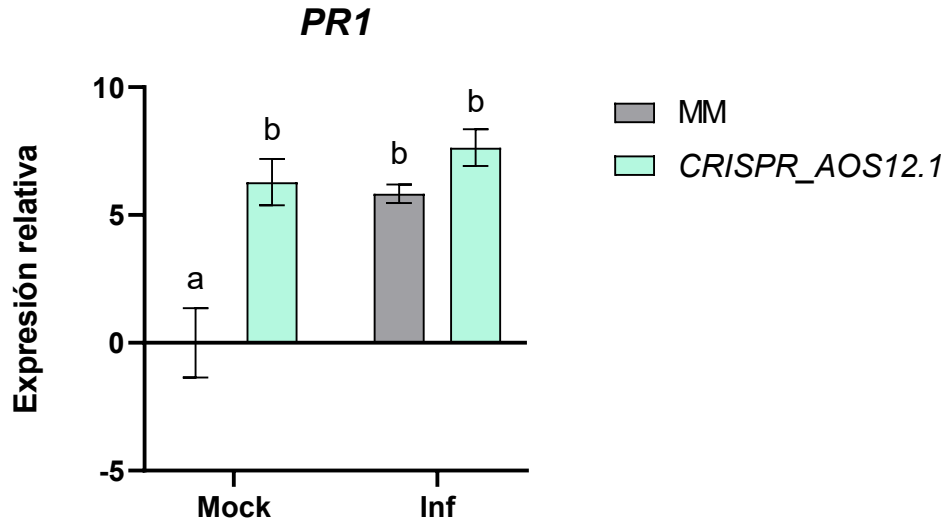


**Figura 10. Nivel de expresión del gen TCI21 en plantas de tomate mutadas en AOS (CRISPR\_AOS12.1) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con *Pst* (inf).** Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con los valores de expresión del gen endógeno Actina. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento. Letras diferentes indican la existencia de diferencia significativa entre plantas mutadas y su parental y la situación basal e infección, con un  $p$ -value  $< 0,05$ .

Los resultados obtenidos en la Figura 10 concuerdan con lo esperado, ya que se observa una inducción de *TCI21* tras la infección, que resultó ser significativamente menor en las plantas *CRISPR\_AOS12.1* con respecto a los de su parental. Cabe destacar que, tras la infección, ambas plantas presentaron significativamente un mayor nivel de expresión de *TCI21* respecto a las no infectadas, por lo que podría sugerirse que *TCI21* está implicado en la respuesta frente a *Pst*. Con los resultados obtenidos en la Figura 10 podríamos decir que las plantas *CRISPR\_AOS12.1* presentan una menor señalización por JA debido a la menor expresión relativa de *TCI21* tras la infección. Dichos resultados coinciden con los previamente descritos en plantas de *Nicotiana attenuata* con el gen AOS silenciado, que presentaron unos menores niveles de acumulación de inhibidores de proteasas tras el ataque de un insecto (Halitschke *et al.*, 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, existe un *cross-talk* entre JA-SA (Zheng *et al.*, 2012). Por tanto, se prosiguió con el estudio de la expresión relativa de *PR1* (Figura 11), que es un gen codificante de proteínas de defensa implicadas en la señalización por SA y GA. Además, se utiliza como marcador clásico de la respuesta a SA y GA y la respuesta defensiva de las plantas (Tornero *et al.*, 1993; van Loon *et al.*, 2006).





**Figura 11. Nivel de expresión del gen PR1 en plantas de tomate mutadas en AOS (CRISPR\_AOS12.1) y su parental MM sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con Pst (inf).** Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con los valores de expresión del gen endógeno Actina. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento. Letras diferentes indican la existencia de diferencia significativa entre plantas mutadas y su parental y la situación basal e infección, con un  $p$ -value  $< 0,05$ .

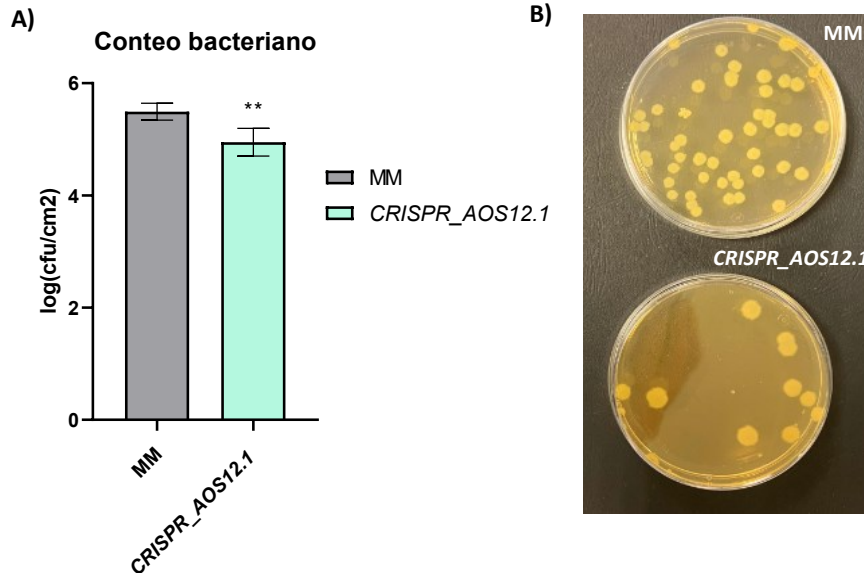
En la Figura 11, se observa una inducción de PR1 en las plantas CRISPR\_AOS12.1 sin infectar con respecto a su parental. Por otra parte, la infección con la bacteria Pst produjo la inducción de este gen, no observándose diferencias significativas entre las plantas CRISPR\_AOS12.1 infectadas y las MM infectadas, aunque se observó cierta tendencia a unos mayores niveles en las plantas CRISPR\_AOS12.1.

En términos generales hemos observado que la mutación en AOS produce una activación de la respuesta defensiva mediada por SA, que se convertiría en su derivado metabólico GA (Figura 5B) por la acción de S5H (Figura 6), aumentando los niveles de PR1 (Figura 11) y disminuyendo los de TC121 (Figura 10), marcadores de SA y JA respectivamente. Estos resultados sugieren que, efectivamente, dicha mutación produciría la redirección de la ruta de las oxilipinas hacia la formación de GLVs, disminuyendo la síntesis de JA. Estudios futuros de determinación de los niveles de JA nos ayudarán a confirmar dichos resultados.

#### **4.1.4. Respuesta defensiva de las plantas CRISPR\_AOS12.1; implicación de los GLVs en la defensa frente a Pst.**

Con el fin de estudiar el efecto que el mayor contenido en GLVs, GA y la inducción de los genes estudiados podría tener sobre la resistencia de las plantas CRISPR\_AOS12.1 frente a Pst, se llevó a cabo la infección con Pst y posterior conteo bacteriano (Figura 12).

Para realizar el conteo se infectaron 5 plantas MM y 5 plantas CRISPR\_AOS12.1 por inmersión, que es el método que más se asemeja a la entrada de Pst en la planta, ya que, las bacterias entrarían por los estomas que son su principal entrada natural al tejido vegetal.



**Figura 12. Crecimiento de *Pst* en plantas de tomate mutadas en AOS (*CRISPR\_AOS12.1*) y su parental MM 24 h después de la inoculación con *Pst*.** (A) Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 plantas independientes de un experimento. El doble (\*\*) asterisco indica la existencia de diferencia significativa de las plantas mutadas respecto a su parental control, con un  $p$ -value  $< 0,005$ . (B) Placas Petri donde se observa el número de colonias crecidas en plantas MM y *CRISPR\_AOS12.1* tras 24 h de la inoculación con *Pst*.

Como se muestra en la Figura 12A, las plantas *CRISPR\_AOS12.1* presentaron una reducción significativa en el contenido de bacteria, confirmando nuestra hipótesis inicial, de que la mutación de AOS y consiguiente mayor emisión de GLVs produciría un aumento de la resistencia. Estos resultados también se muestran en la imagen de las placas (Figura 12B), donde el número de colonias es significativamente menor en el caso de las plantas *CRISPR\_AOS12.1*. Por tanto, hemos confirmado el papel defensivo de estos compuestos volátiles, que se ha descrito que tiene lugar a través del cierre estomático y la inducción basal de genes defensivos como *PR1*.

Nuestros resultados se suman a los previamente obtenidos por nuestro grupo, en los que se demuestra que los GLVs juegan un papel importante en la respuesta defensiva. En concreto, se observó que los ésteres volátiles de (Z)-3-hexenol con ácido acético (HA), propiónico (HP), isobutírico (HiB) o butírico (HB) se emiten de manera diferencial en plantas de tomate ante una infección por *Pst* y se analizó la inducción de la resistencia mediada por estos GLVs, confirmando que plantas tratadas con HP y sobre todo, aquellas tratadas con HB presentaban una activación de genes relacionados con la defensa y presentaban una mayor resistencia a bacteria, incluyendo este resultado en otras especies pertenecientes a *Nicotiana*, *Arabidopsis*, *Medicago*, *Zea* y el género *Citrus* (López-Gresa *et al.*, 2018; Payá *et al.*, *under review*).

De este modo, los resultados obtenidos confirman el papel defensivo de los GLVs, produciendo un aumento de la resistencia frente a *Pst*.

## 4.2. Elucidación del papel defensivo del inhibidor de proteasas TCI21.

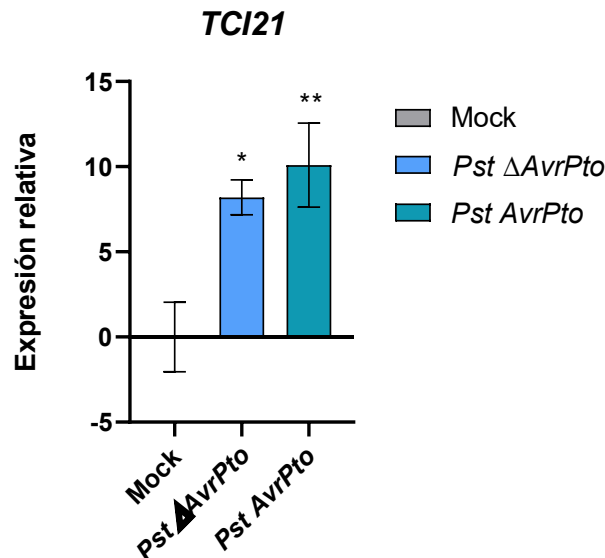
El daño causado por herida en la planta activa la respuesta mediada por JA, consecuentemente activando a los PIN (Farmer *et al.*, 1992). Estos PIN se han descrito principalmente como toxinas para los insectos ya que interfieren con su crecimiento y desarrollo impidiendo que éstos accedan al substrato, provocando una menor disponibilidad de aminoácidos y en algunos casos, la muerte. En particular, se ha sugerido que *TCI21* codifica un inhibidor de quimotripsina perteneciente al grupo de serín-proteasas, puesto que su sobreexpresión en plantas de tomate provoca un retraso en el crecimiento e incluso la muerte de larvas de *Spodoptera littoralis*, cuyos enzimas digestivos son principalmente de tipo serín-proteasa (Lisón *et al.*, 2006).

### 4.2.1. Estudio de la expresión diferencial de *TCI21* en diferentes contextos defensivos.

Los PIN se inducen en las plantas de tomate tras la acumulación de JA. En nuestro laboratorio, se describió la acumulación de esta oxilipina asociada a una infección con una cepa avirulenta de la bacteria *Pst* en plantas de tomate, esto es, durante el establecimiento de ETI (López-Gresa *et al.*, 2017). Asimismo, en este trabajo hemos observado que *TCI21* se induce en plantas MM infectadas con *Pst* (Figura 10). Con el fin de profundizar en el patrón de expresión de *TCI21*, se analizó la expresión de este PIN tras diferentes infecciones y tratamientos.

#### 4.2.1.1. Infección por *Pst* virulenta ( $\Delta$ AvrPto) y avirulenta (AvrPto).

Con el fin de estudiar el patrón de expresión de *TCI21* tras una infección bacteriana en plantas de tomate, se llevó a cabo la infección de plantas de tomate Rio Grande, portadoras del gen *Pto*, con 2 cepas de la bacteria *Pst*, una de ellas avirulenta, portadora del gen *AvrPto* (*AvrPto*) y otra con una cepa virulenta, portadora de una versión delecionada del gen *AvrPto* ( $\Delta$ AvrPto) (Figura 13). En la infección *Pst*  $\Delta$ AvrPto la planta Rio Grande es susceptible a la enfermedad debido a la ausencia de interacción entre el factor de avirulencia (*AvrPto*) y la proteína de resistencia (*Pto*), mientras que en la infección *Pst* *AvrPto*, la planta es resistente porque el factor de avirulencia interacciona con la proteína de resistencia y activa la respuesta hipersensible y consiguiente ETI.



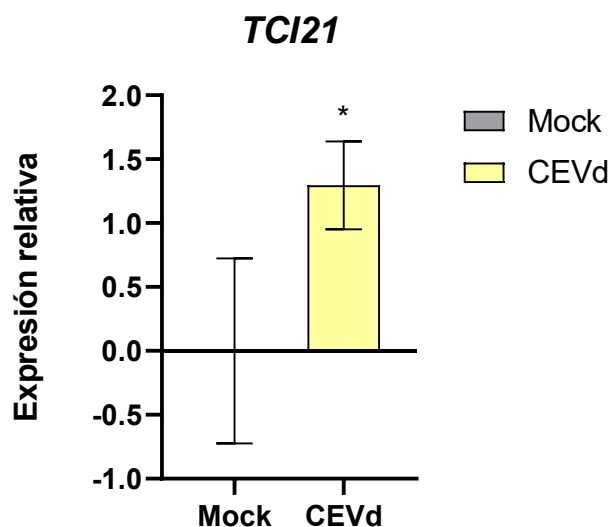
**Figura 13.** Nivel de expresión del gen *TCI21* en plantas de tomate Rio Grande sin infectar (Mock), infectadas por *Pst* virulenta ( $\Delta$ AvrPto) y avirulenta (AvrPto). Los valores de RT-qPCR fueron

normalizados con los valores de expresión del gen endógeno Actina. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento. El simple (\*) y doble (\*\*) asterisco indican que existe una diferencia significativa entre las plantas infectadas con *Pst*  $\Delta$ AvrPto y *Pst* Avrpto respecto a mock, con un p-value < 0,05 y p-value < 0,005, respectivamente.

Como se puede observar en la Figura 13, la expresión de *TCI21* se indujo ante ambas infecciones, siendo mayor la inducción frente a *Pst* avirulenta (AvrPto). Estos resultados correlacionan con los niveles de JA observados en plantas de tomate, donde la interacción avirulenta produjo mayores niveles de acumulación de JA, lo que podría indicar un nuevo papel defensivo de *TCI21* en la respuesta a una infección por *Pst* (López-Gresa *et al.*, 2018).

#### 4.2.1.2. Infección con Citrus Exocortis Viroid (CEVd).

Debido al interés en el inhibidor de proteasas se continuó con el análisis de expresión relativa de *TCI21* en diferentes contextos defensivos. Se estudió la expresión en plantas de tomate infectadas por el viroide CEVd (Figura 14).



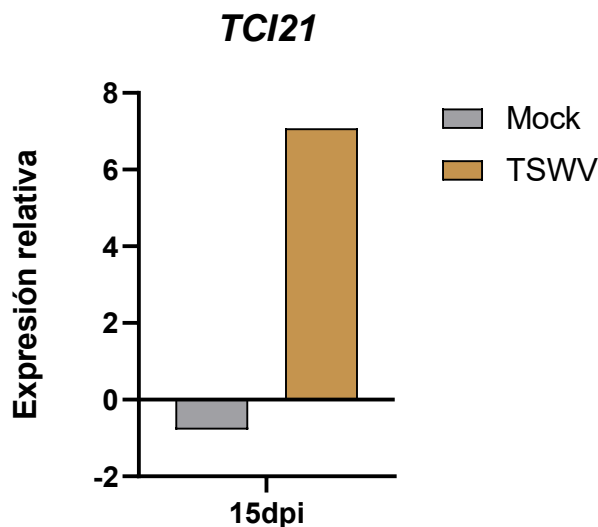
**Figura 14. Nivel de expresión del gen *TCI21* en plantas de tomate MM sin infectar (Mock) e infectadas por el viroide (Citrus Exocortis Viroid, CEVd).** Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con los valores de expresión del gen endógeno Actina. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento. El simple (\*) asterisco indica que existe significación estadística con un p-value < 0,05.

Según los resultados obtenidos, se observa una inducción significativa en la expresión de *TCI21* tres semanas después de la infección por CEVd. Por tanto, *TCI21* podría estar implicado en la respuesta defensiva frente a viroides. Estos dos resultados coinciden con los obtenidos para el del inhibidor de proteasas PIN2s, que es un inhibidor de serín-proteasas inducido en contextos de infección bacteriana (Pautot *et al.*, 1991) y de viroides (Gadea *et al.*, 1996).

#### 4.2.1.3. Infección con Tomato spotted wilt virus (TSWV).

Otro de los contextos defensivos en el que se estudió la expresión de *TCI21* fue en plantas de tomate infectadas por el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) con el fin de

comprobar si el inhibidor de proteasas podría estar implicado en la defensa de las plantas frente a este virus (Figura 15).



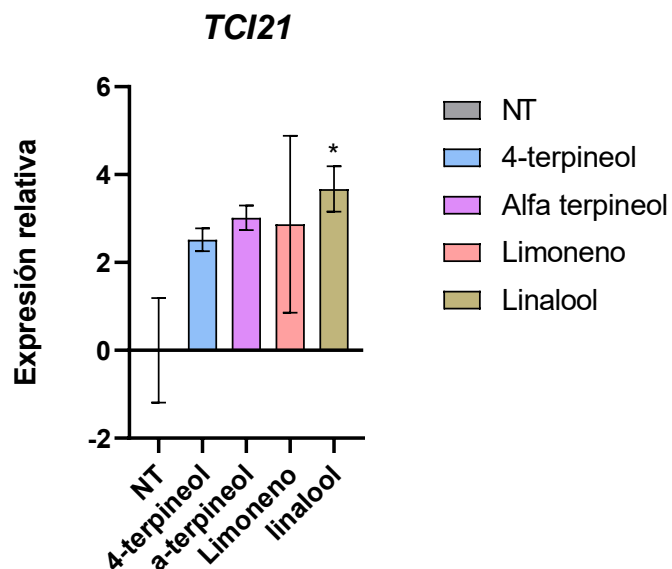
**Figura 15. Nivel de expresión del gen *TCI21* en plantas de tomate MM sin infectar (Mock) e infectadas por el virus (Tomato spotted wilt virus, TSWV).** Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con los valores de expresión del gen endógeno *Actina*. Los resultados se corresponden con el valor de expresión obtenido de 1 planta independiente de un experimento.

Los resultados presentes en la Figura 15 muestran que, 15 días después de la infección (15 dpi), hay una inducción en la expresión de *TCI21* en plantas infectadas con el virus TSWV. El procesamiento de poliproteínas es crucial en la replicación de los virus y los inhibidores de proteasas podrían mediar la resistencia a virus de plantas mediante la inhibición de proteasas virales (Sabotič y Kos, 2012). Además, se ha demostrado que plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen que codifica un inhibidor de cisteín-proteinasas tienen resistencia frente a potivirus (Gutierrez-Campos *et al.*, 1999). De este modo, planteamos que *TCI21* podría estar implicado en la inhibición de proteasas virales de TSWV.

En el futuro nos planteamos realizar repeticiones para confirmar la inducción observada. No obstante, nuestros resultados preliminares parecen indicar que este inhibidor de quimotripsina podría estar implicado en la defensa frente a dicho virus.

#### **4.2.1.4. Tratamientos exógenos con monoterpenoides.**

Se ha estudiado además la expresión de *TCI21* tras la aplicación exógena de VOCs. Se observó que la expresión de *TCI21* se inducía de manera significativa en plantas de tomate pasadas 24 horas del tratamiento con ésteres de acético (HA), propiónico (HP), isobutírico (HiB) o butírico (HB) del (Z)-3-hexenol (López-Gresa *et al.*, 2018). Por tanto, decidimos estudiar la expresión relativa de *TCI21* tras el tratamiento con monoterpenoides, otro grupo de VOCs que, al igual que los GLVs, se emite diferencialmente por plantas de tomate durante el establecimiento de ETI (Figura 16).



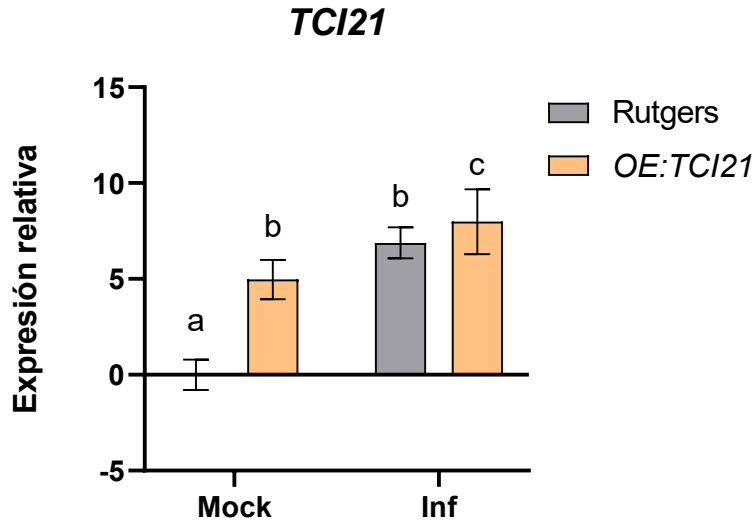
**Figura 16. Nivel de expresión del gen *TCI21* en plantas de tomate MM no tratadas (NT) y tratadas con 4-terpineol, α-terpineol, limoneno y linalool.** Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con los valores de expresión del gen endógeno *Actina*. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento. El simple (\*) asterisco indica que existe significación estadística entre el tratamiento y el no tratamiento, con un  $p$ -value  $< 0,05$ .

Los resultados muestran una inducción de *TCI21* en las plantas tratadas con 4-terpineol, α-terpineol, limoneno y linalool respecto a las plantas control (NT). Sin embargo, la única inducción que resultó significativa fue tras el tratamiento con linalool. Finalmente, estos resultados podrían indicar que la expresión del inhibidor de proteasas se induce por tratamientos exógenos con VOCS defensivos como los monoterpenos.

#### **4.2.2. Estudio del papel de *TCI21* en la respuesta defensiva y la resistencia frente a *Pst*.**

Una vez estudiado el patrón de expresión de *TCI21* bajo diferentes contextos patogénicos y tratamientos exógenos, se procedió a la caracterización de las plantas transgénicas que sobreexpresan la proteína *TCI21* (*OE:TCI21*) frente a la infección con la bacteria *Pst*. Merece la pena destacar que el parental de estas plantas es Rutgers, una variedad de tomate que no posee el gen de resistencia *Pto*, por lo que las infecciones bacterianas realizadas fueron de tipo virulento.

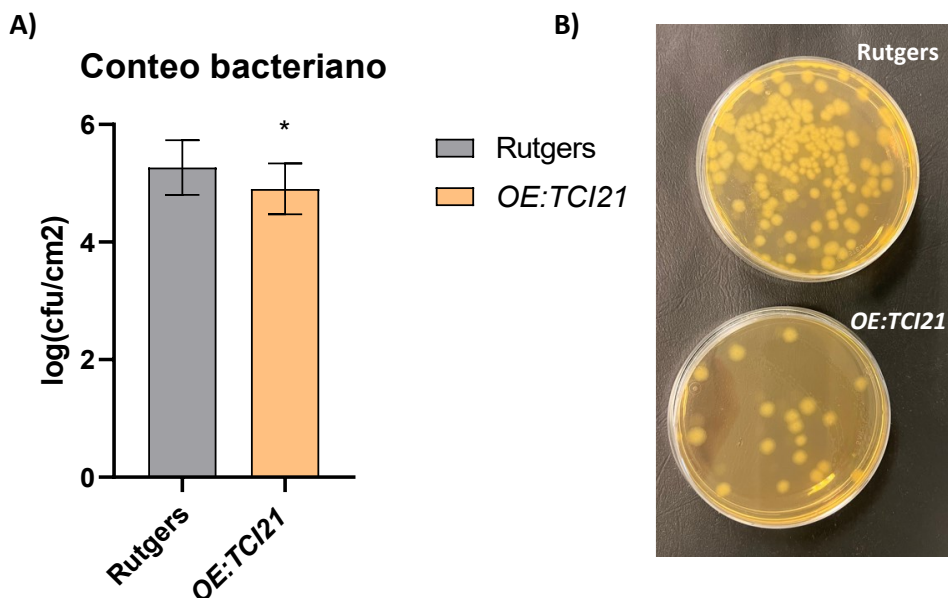
Con el fin de caracterizar las plantas *OE:TCI21*, se realizó un análisis de la expresión relativa de *TCI21* en condiciones de no infección (Mock) y de infección con *Pst* (Inf), tanto de las plantas transgénicas que sobreexpresan la proteína *TCI21* (*OE:TCI21*) como de su parental control (Rutgers) (Figura 17).



**Figura 17. Nivel de expresión del gen TCI21 en plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan TCI21 (OE:TCI21) y su parental (Rutgers) sin infectar (mock) y 24 h después de la inoculación con *Pst* (inf).** Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con los valores de expresión del gen endógeno Actina. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento. Letras diferentes indican la existencia de diferencia significativa entre plantas transgénicas y su parental y la situación basal e infección, con un  $p$ -value  $< 0,05$ .

En la Figura 17 se puede observar que las plantas transgénicas muestran un mayor nivel de expresión de *TCI21* respecto a sus controles. En concreto, se observa que las plantas OE:TCI21 no infectadas presentan mayor expresión que su correspondiente parental Rutgers sin infectar, confirmando así la sobreexpresión de *TCI21*. Además, tras 24 horas de la infección, en las plantas transgénicas se observa una mayor inducción en la expresión de *TCI21* que en las plantas Rutgers infectadas.

Consecuentemente, tras observar la inducción de *TCI21* después de la infección por *Pst* y ver que su expresión es mayor en plantas infectadas que sobreexpresan dicha proteína, se estudió la posible resistencia frente a *Pst* en las plantas OE:TCI21. Para comprobarlo se realizó la infección con *Pst* y posterior conteo bacteriano empleando 5 plantas OE:TCI21 y 5 Rutgers una vez pasadas 24 horas de la infección (Figura 18). Las plantas fueron infectadas mediante el método de inmersión, que asemeja la forma de entrada del patógeno en la planta a través de los estomas.



**Figura 18. Crecimiento de *Pst* en plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan TCI21 (OE:TCI21) y su parental (Rutgers) 24 h después de la inoculación con *Pst*.** (A) Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 plantas independientes de un experimento representativo. El simple (\*) asterisco indica la existencia de diferencia significativa de las plantas transgénicas respecto a su parental control, con un  $p$ -value  $< 0,05$ . (B) Placas Petri donde se observa el número de colonias crecidas en plantas Rutgers y OE:TCI21 tras 24 h de la inoculación con *Pst*.

Finalmente, los resultados del conteo aparecen en la Figura 18 y nos muestran que las plantas que sobreexpresan TCI21 son significativamente más resistentes a la infección por *Pst* que sus parentales. Estos resultados también se observan en la imagen de las placas, donde el número de colonias es significativamente menor en el caso de OE:TCI21.

TCI21 es una proteína comúnmente asociada al ataque de herbívoros. Con este trabajo se le ha dado una nueva función. Sorprendentemente, tras el perfil de inducción en los diferentes contextos infectivos y observando la resistencia de las plantas transgénicas que sobreexpresan dicha proteína, se podría concluir que esta proteína puede relacionarse de forma general con la respuesta defensiva frente a varios patógenos y con la resistencia frente a *Pst*.

La síntesis de inhibidores de proteasas es una respuesta mediada por JA en la planta ante el daño causado por herida (Farmer *et al.*, 1992). Además, como se ha comentado anteriormente, se ha observado una mayor inducción frente a *Pst* avirulenta (*AvrPto*) (Figura 13), lo cual concuerda con los niveles de JA observados en plantas de tomate, donde la interacción avirulenta produjo los mayores niveles de acumulación (López-Gresa *et al.*, 2018). De este modo, es posible que la síntesis de TCI21 mediada por JA, también confiera resistencia a *Pst*.

*Pseudomonas syringae* tiene una serín-proteasa denominada Lon, perteneciente al sistema de secreción de tipo III y que es necesaria para su patogénesis (Yang *et al.*, 2011). Además, se ha observado que la sobreexpresión de inhibidores de serín-proteasas, como los PIs de tipo-Kunitz (PKPI) y tipo I de patata (Pin1), confieren a la planta un aumento en la resistencia al patógeno bacteriano *P. syringae* (Turrà *et al.*, 2020). Por lo que, este inhibidor de proteasas TCI21 podría



interaccionar con Lon confiriendo resistencia frente a la bacteria. Asimismo, en *Arabidopsis thaliana* se ha descrito que el inhibidor de serín proteasas *AtSERPIN1* produce la inhibición de la metacaspasa *AtMC1* que regula positivamente la HR durante la ETI (Lema Asqui *et al.*, 2018).

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, donde se observa la inducción de *TCI21* en plantas de tomate después de 24 horas de la infección, y el menor número de bacterias crecidas en plantas que sobreexpresan este inhibidor de quimotripsina perteneciente al grupo de serín-proteasas (*OE:TCI21*), sería posible que *TCI21* estuviera inhibiendo la proteasa Lon como mecanismo de defensa y conferir así resistencia frente a patógenos biotrofos. Asimismo, y de manera similar a la descrita en *Arabidopsis* para *AtSERPIN1*, *TCI21* podría estar participando en la regulación de los procesos de muerte celular que tienen lugar durante la infección con *Pst* en plantas de tomate. Por otra parte, la participación de proteasas en la HR y en los procesos de muerte celular programada se ha extendido a otras familias, incluyendo cisteína y treonina proteasas, por lo que otros inhibidores de proteasas podrían estar también implicados en la respuesta defensiva frente a bacteria (Salguero-Linares y Coll, 2019), ampliando la función defensiva de estos más allá de la respuesta frente a insectos.

### 4.3. Perspectivas futuras.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto muestran que la mutación en *AOS* produce la activación de la respuesta defensiva mediada por SA, convirtiéndose en GA (Figura 5B) por acción de S5H (Figura 6), de manera que aumentan los niveles de *PR1* (Figura 11) y disminuyen los de *TCI21* (Figura 10), siendo estos marcadores de SA y JA, respectivamente. Esta disminución en los niveles de *TCI21* coincide con los resultados observados plantas de *Nicotiana attenuata* con el gen *AOS* silenciado, que presentaron unos menores niveles de acumulación de inhibidores de proteasas tras el ataque de un insecto (Halitschke *et al.*, 2004). De este modo, se consigue la redirección de la ruta de las oxilipinas hacia la síntesis de GLVs y, por consiguiente, una menor síntesis de JA. A modo de perspectiva futura se van a medir los niveles de JA en plantas *CRISPR\_AOS12.1* en condiciones de infección por *Pst* y no infección para confirmar la menor síntesis de JA. Además, se profundizará en el papel de S5H en estas plantas mutantes, ya que parece que la mutación en el gen *AOS* afecta al metabolismo del SA. Por último, se utilizarán las plantas *CRISPR\_AOS12.1* para experimentos de comunicación entre plantas. Para ello, se cohabitarán plantas receptoras de tomate (*r-plants*) con plantas emisoras (*e-plants*) MM o *CRISPR\_AOS12.1* y se estudiará si las *r-plants* cohabitadas con las *CRISPR\_AOS12.1*, que emiten mayores niveles de GLVs, son más resistentes a *Pst*. Estos experimentos permitirán confirmar el papel de los GLVs en la respuesta defensiva no sólo intra-planta sino también inter-planta.

Por otra parte, se quiere profundizar en los mecanismos específicos de la implicación de *TCI21* en la resistencia frente a *Pst*. Para ello, se podría realizar un estudio de co-inmunoprecipitación con un anticuerpo específico para *TCI21* y otro para Lon, y ver si ambos interaccionan, ya que Lon es una serín-proteasa de *Pseudomonas syringae* necesaria para su patogénesis (Yang *et al.*, 2011). Así se podría concluir la especificidad de *TCI21* por la proteína de *Pst* y explicar su implicación en la respuesta defensiva. De este modo se podría estudiar si es posible que la resistencia observada en plantas que sobreexpresan *TCI21* (Figura 18) es debida a la inhibición de la serín-proteasa Lon. Asimismo, se analizará la conductividad (medida del daño celular) de las plantas infectadas *OE:TCI21* y sus correspondientes parentales con el fin de explorar la posibilidad de que *TCI21* actuara como inhibidor de la muerte celular, tal y como se ha descrito para *AtSERPIN1*.

## 5. CONCLUSIONES

1. Los GLVs juegan un papel defensivo en plantas de tomate frente a la cepa DC3000 de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), puesto que las plantas *CRISPR\_AOS12.1*, que presentan mayores niveles de emisión de GLVs, son más resistentes a dicha bacteria.
2. La resistencia de las plantas *CRISPR\_AOS12.1* frente a *Pst* se correlaciona con una activación de la respuesta defensiva mediada por SA, catabolizándose a GA por la acción de S5H, de manera que aumentan los niveles de *PR1* y disminuyen los de *TCI21*, marcadores de SA y JA, respectivamente.
3. Los menores niveles de expresión relativa de *TCI21* en las plantas *CRISPR\_AOS12.1* infectadas con *Pst* sugieren que existe un *cross-talk* metabólico entre la ruta de biosíntesis del JA y de los GLVs en plantas de tomate, posiblemente causado por la limitación del sustrato que comparten ambas rutas.
4. El inhibidor de quimotripsina *TCI21* podría estar implicado en la defensa frente al viroide CEVd (*Citrus Exocortis Viroid*), al virus del bronceado del tomate (TSWV) y a la bacteria *Pseudomonas syringae* (*Pst*), además de estar implicado en la señalización mediada por monoterpenos como el linalool.
5. *TCI21* juega un papel importante en la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a *Pst*, debido a que las plantas *OE:TCI21*, que sobreexpresan *TCI21*, presentan resistencia frente a dicha bacteria.

## 6. 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>

ALFANO, J. R.; CHARKOWSKI, A. O.; DENG, W. L.; BADEL, J. L.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; VAN DIJK, K.; & COLLMER, A. (2000). The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4856–4861. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.9.4856>

BELA, K.; HORVÁTH, E.; GALLÉ, Á.; SZABADOS, L.; TARI, I.; & CSISZÁR, J. (2015). Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of plant physiology*, 176, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.12.014>

BELLÉS, J. M.; GARRO, R.; FAYOS, J.; NAVARRO, P.; PRIMO, J.; & CONEJERO, V. (1999). Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(3), 227-235. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.3.227>

BUCHANAN B.; GRUISSEM W.; & JONES R. (2002). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*.

CAMPOS, L.; GRANELL, P.; TÁRRAGA, S.; LÓPEZ-GRESA, P.; CONEJERO, V.; BELLÉS, J. M.; RODRIGO, I.; & LISÓN, P. (2014). Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 77, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.016>

- CAMPOS, M. L.; KANG, J. H.; & HOWE, G. A. (2014). Jasmonate-triggered plant immunity. *Journal of chemical ecology*, 40(7), 657–675. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0468-3>
- CHEN, G.; HACKETT, R.; WALKER, D.; TAYLOR, A.; LIN, Z.; & GRIERSON, D. (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant physiology*, 136(1), 2641–2651. <https://doi.org/10.1104/pp.104.041608>
- COLLMER, A.; LINDEBERG, M.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; SCHNEIDER, D. J.; & ALFANO, J. R. (2002). Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends in microbiology*, 10(10), 462–469. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)02451-4](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)02451-4)
- CONRATH, U. (2006). Systemic acquired resistance. *Plant signaling & behavior*, 1(4), 179–184. <https://doi.org/10.4161/psb.1.4.3221>
- CROFT, K.; JUTTNER, F., & SLUSARENKO, A. J. (1993). Volatile Products of the Lipoxygenase Pathway Evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) Leaves Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant physiology*, 101(1), 13–24. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.13>
- D'AURIA, J. C.; PICHERSKY, E.; SCHAUB, A.; HANSEL, A.; & GERSHENZON, J. (2007). Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 49(2), 194–207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02946.x>
- DING, P.; & DING, Y. (2020). Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends in plant science*, 25(6), 549–565. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.004>
- DU, X.; PLOTTO, A.; BALDWIN, E.; & ROUSEFF, R. (2011). Evaluation of volatiles from two subtropical strawberry cultivars using GC-olfactometry, GC-MS odor activity values, and sensory analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(23), 12569–12577. <https://doi.org/10.1021/jf2030924>
- DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; & KAPLAN, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *The New phytologist*, 198(1), 16–32. <https://doi.org/10.1111/nph.12145>
- FAN, S. G.; & GUO-JIANG, W. U. (2005). Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46.
- FARMER, E. E.; JOHNSON, R. R.; & RYAN, C. A. (1992). Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic Acid. *Plant physiology*, 98(3), 995–1002. <https://doi.org/10.1104/pp.98.3.995>
- FAUCONNIER, M. L.; MPAMBARA, A.; DELCARTE, J.; JACQUES, P.; THONART, P.; & MARLIER, M. (1999). Conversion of green note aldehydes into alcohols by yeast alcohol dehydrogenase. *Biotechnology letters*, 21, 629-633. <https://doi.org/10.1023/A:1005593821577>
- FEUSSNER, I.; & WASTERNAK, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual review of plant biology*, 53, 275–297. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>
- FITOUSSI, N.; BORREGO, E.; KOLOMIETS, M. V.; QING, X.; BUCKI, P.; SELA, N.; BELAUSOV, E.; & BRAUN MIYARA, S. (2021). Oxylipins are implicated as communication signals in tomato-root-knot

nematode (*Meloidogyne javanica*) interaction. *Scientific reports*, 11(1), 326. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79432-6>

FLOR, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, 9(1), 275-296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>

FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; & BAK, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 10242–10297. <https://doi.org/10.3390/ijms140510242>

GADEA, J.; MAYDA, M. E.; CONEJERO, V.; & VERA, P. (1996). Characterization of defense-related genes ectopically expressed in viroid-infected tomato plants. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 9(5), 409–415. <https://doi.org/10.1094/mpmi-9-0409>

GARDAN, L.; SHAFIK, H.; BELOUIN, S.; BROCH, R.; GRIMONT, F.; & GRIMONT, P. A. (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International journal of systematic bacteriology*, 49 Pt 2, 469–478. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-469>

GFELLER, A.; DUBUGNON, L.; LIECHTI, R.; & FARMER, E. E. (2010). Jasmonate biochemical pathway. *Science signaling*, 3(109), cm3. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3109cm3>

GIGOT, C.; ONGENA, M.; FAUCONNIER, M. L.; WATHELET, J. P.; DU JARDIN, P.; & THONART, P. (2010). The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *BASE*. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=5669>

GLAZEBROOK, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology*, 43, 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>

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)

GUTIERREZ-CAMPOS, R.; TORRES-ACOSTA, J. A.; SAUCEDO-ARIAS, L. J.; & GOMEZ-LIM, M. A. (1999). The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature biotechnology*, 17(12), 1223–1226. <https://doi.org/10.1038/70781>

HALITSCHKE, R.; ZIEGLER, J.; KEINÄNEN, M.; & BALDWIN, I. T. (2004). Silencing of hydroperoxide lyase and allene oxide synthase reveals substrate and defense signaling crosstalk in *Nicotiana attenuata*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 40(1), 35–46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02185.x>

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; & KHAN, R. H. (2004). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of biochemistry and biophysics*, 431(1), 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.07.022>

HOUMANI, H.; RODRÍGUEZ-RUIZ, M.; PALMA, J. M.; & CORPAS, F. J. (2018). Mechanical wounding promotes local and long distance response in the halophyte *Cakile maritima* through the involvement of the ROS and RNS metabolism. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 74, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.06.008>

- HOWE, G. A.; & JANDER, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual review of plant biology*, 59, 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>
- 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. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- KLESSIG, D. F.; CHOI, H. W.; & DEMPSEY, D. A. (2018). Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 31(9), 871–888. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR>
- LEMA ASQUI, S.; VERCAMMEN, D.; SERRANO, I.; VALLS, M.; RIVAS, S.; VAN BREUSEGEM, F.; CONLON, F. L.; DANGL, J. L.; & COLL, N. S. (2018). AtSERPIN1 is an inhibitor of the metacaspase AtMC1-mediated cell death and autocatalytic processing in planta. *The New phytologist*, 218(3), 1156–1166. <https://doi.org/10.1111/nph.14446>
- LISÓN, P.; RODRIGO, I.; & CONEJERO, V. (2006). A novel function for the cathepsin D inhibitor in tomato. *Plant physiology*, 142(3), 1329–1339. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086587>
- 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), e0166938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166938>
- LÓPEZ-GRESA, M. P.; PAYÁ, C.; OZÁEZ, M.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V.; KLEE, H.; BELLÉS, J. M.; & LISÓN, P. (2018). A New Role For Green Leaf Volatile Esters in Tomato Stomatal Defense Against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Frontiers in plant science*, 9, 1855. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01855>
- MADANI, B.; MIRSHEKARI, A.; & IMAHORI, Y. (2019). Physiological responses to stress. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 405-423). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00020-8>
- MARIOTTO, M.; DUBY, F.; ADAM, A.; BUREAU, C.; FAUCONNIER, M. L.; ONGENA, M.; THONART, P.; & DOMMES, J. (2011). The elicitation of a systemic resistance by *Pseudomonas putida* BTP1 in tomato involves the stimulation of two lipoxygenase isoforms. *BMC plant biology*, 11, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-29>
- NARUSAKA, M.; SHIRASU, K.; NOUTOSHI, Y.; KUBO, Y.; SHIRAISHI, T.; IWABUCHI, M.; & NARUSAKA, Y. (2009). RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 60(2), 218–226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03949.x>
- NEGRE-ZAKHAROV, F.; LONG, M. C.; & DUDAREVA, N. (2009). Floral scents and fruit aromas inspired by nature. *Plant-derived natural products: Synthesis, function, and application*, 405-431. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-85498-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-0-387-85498-4_19)

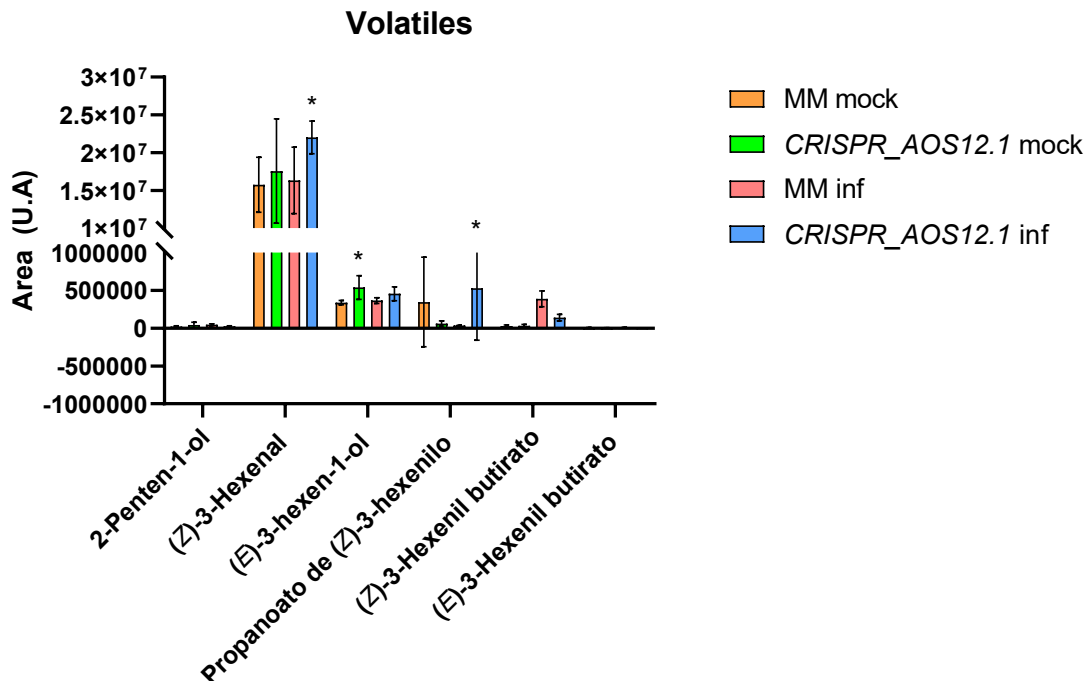
- OROZCO-CÁRDENAS, M. L.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; & RYAN, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant cell*, 13(1), 179–191. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.179>
- PAUTOT, V.; HOLZER, F. M.; & WALLING, L. L. (1991). Differential expression of tomato proteinase inhibitor I and II genes during bacterial pathogen invasion and wounding. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 4(3), 284–292. <https://doi.org/10.1094/mpmi-4-284>
- PAYÁ, C. (2017). Estudio del papel defensivo y del mecanismo de acción de los ésteres del Z-3-hexenol en plantas de tomate frente a *Pseudomonas syringae*. <http://hdl.handle.net/10251/85377>.
- PAYÁ, C.; BELDA-PALAZÓN, B.; VERA-SIRERA, F.; PÉREZ-PÉREZ, J.; JORDÁ, L.; RODRIGO, I.; BELLÉS, J. M.; LÓPEZ-GRESA, M. P.; & LISÓN, P. (under review). Signaling mechanisms and agricultural applications of (Z)-3-Hexenyl Butyrate-mediated stomatal closure. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.05.26.542418>
- PAYÁ, C.; LÓPEZ-GRESA, M. P.; INTRIGLIOLO, D. S.; RODRIGO, I.; BELLÉS, J. M.; & LISÓN, P. (2020). (Z)-3-Hexenyl Butyrate Induces Stomata Closure and Ripening in *Vitis vinifera*. *Agronomy*, 10(8), 1122. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081122>
- PAYÁ, C.; MINGUILLÓN, S.; HERNÁNDEZ, M.; MIGUEL, S. M.; CAMPOS, L.; RODRIGO, I.; BELLÉS, J. M.; LÓPEZ-GRESA, M. P.; & LISÓN, P. (2022). SIS5H silencing reveals specific pathogen-triggered salicylic acid metabolism in tomato. *BMC plant biology*, 22(1), 549. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03939-5>
- PENG, Y.; VAN WERSCH, R.; & ZHANG, Y. (2018). Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 31(4), 403–409. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0145-CR>
- PHUONG, L. T.; FITRIANTI, A. N.; LUAN, M. T.; MATSUI, H.; NOUTOSHI, Y.; YAMAMOTO, M.; ICHINOSE, Y.; SHIRAIISHI T.; & TOYODA, K. (2020). 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-x>
- PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; & DUDAREVA, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5762), 808–811. <https://doi.org/10.1126/science.1118510>
- ROBERT-SEILANIANZ, A.; GRANT, M.; & JONES, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology*, 49, 317–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>
- RONALD, P. C.; SALMERON, J. M.; CARLAND, F. M.; & STASKAWICZ, B. J. (1992). The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *Journal of bacteriology*, 174(5), 1604–1611. <https://doi.org/10.1128/jb.174.5.1604-1611.1992>
- RUAN, J.; ZHOU, Y.; ZHOU, M.; YAN, J.; KHURSHID, M.; WENG, W.; CHENG, J.; & ZHANG, K. (2019). Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2479. <https://doi.org/10.3390/ijms20102479>

- SABOTIČ, J.; & KOS, J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 93, 1351-1375. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3834-x>
- SALGUERO-LINARES, J.; & COLL, N. S. (2019). Plant proteases in the control of the hypersensitive response. *Journal of experimental botany*, 70(7), 2087–2095. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz030>
- SCALSCHI, L.; LLORENS, E.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; & VICEDO, B. (2020). Role of Jasmonic Acid Pathway in Tomato Plant-Pseudomonas syringae Interaction. *Plants* (Basel, Switzerland), 9(2), 136. <https://doi.org/10.3390/plants9020136>
- SCHEER, J. M.; & RYAN, C. A., JR. (2002). The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), 9585–9590. <https://doi.org/10.1073/pnas.132266499>
- SCHILLMILLER, A. L.; & HOWE, G. A. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.008>
- SPINELLI, F.; NOFERINI, M.; VANNESTE, J. L.; & COSTA, G. (2010). Potential of the electronic-nose for the diagnosis of bacterial and fungal diseases in fruit trees. *EPPO bulletin*, 40(1), 59-67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2009.02355.x>
- TÁRRAGA, S.; LISÓN, P.; LÓPEZ-GRESA, M. P.; TORRES, C.; RODRIGO, I.; BELLÉS, J. M.; & 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>
- TOOME, M.; RANDJÄRV, P.; COPOLOVICI, L.; NIINEMETS, U.; HEINSOO, K.; LUIK, A.; & NOE, S. M. (2010). Leaf rust induced volatile organic compounds signalling in willow during the infection. *Planta*, 232(1), 235–243. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1169-y>
- 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(1), 325. <https://doi.org/10.1104/pp.102.1.325>
- TURRÀ, D.; VITALE, S.; MARRA, R.; WOO, S. L.; & LORITO, M. (2020). Heterologous Expression of PKPI and Pin1 Proteinase Inhibitors Enhances Plant Fitness and Broad-Spectrum Resistance to Biotic Threats. *Frontiers in plant science*, 11, 461. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00461>
- UL HASSAN, M. N.; ZAINAL, Z.; & ISMAIL, I. (2015). Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant biotechnology journal*, 13(6), 727–739. <https://doi.org/10.1111/pbi.12368>
- VAN LOON, L. C.; REP, M.; & PIETERSE, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual review of phytopathology*, 44, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- WEI, H. L.; & COLLMER, A. (2018). Defining essential processes in plant pathogenesis with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 disarmed polymutants and a subset of key type III effectors. *Molecular plant pathology*, 19(7), 1779–1794. <https://doi.org/10.1111/mpp.12655>

- XIN, X. F.; & HE, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual review of phytopathology*, 51, 473–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>
- XIN, X. F.; KVITKO, B.; & HE, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature reviews. Microbiology*, 16(5), 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>
- YACTAYO-CHANG, J. P.; HUNTER, C. T.; ALBORN, H. T.; CHRISTENSEN, S. A.; & BLOCK, A. K. (2022). Production of the Green Leaf Volatile (Z)-3-Hexenal by a *Zea mays* Hydroperoxide Lyase. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(17), 2201. <https://doi.org/10.3390/plants11172201>
- YAN, L.; ZHAI, Q.; WEI, J.; LI, S.; WANG, B.; HUANG, T.; DU, M.; SUN, J.; KANG, L.; LI, C. B.; & LI, C. (2013). Role of tomato lipoxygenase D in wound-induced jasmonate biosynthesis and plant immunity to insect herbivores. *PLoS genetics*, 9(12), e1003964. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003964>
- YANG, H. J.; LEE, J. S.; CHA, J. Y.; & BAIK, H. S. (2011). Negative regulation of pathogenesis in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 11528 by ATP-dependent Lon protease. *Molecules and cells*, 32(4), 317–323. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-1017-3>
- 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>
- ZHENG, X. Y.; SPIVEY, N. W.; ZENG, W.; LIU, P. P.; FU, Z. Q.; KLESSIG, D. F.; HE, S. Y.; & DONG, X. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell host & microbe*, 11(6), 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.014>
- ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; NAVARRO, L.; OAKELEY, E. J.; JONES, J. D.; FELIX, G.; & BOLLER, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428(6984), 764–767. <https://doi.org/10.1038/nature02485>



## 7. ANEXOS



**Figura 15.** Emisión de VOCs en plantas tomate mutadas en AOS (*CRISPR\_AOS12.1*) y su parental MM sin infectar (*mock*) y 24 h después de la inoculación con *Pst* (*inf*). Cuantificación relativa en unidades arbitrarias (UA) de los niveles de 2-Penten-1-ol, (Z)-3-Hexenal, (E)-3-hexen-1-ol, propanoato de (Z)-3-hexenilo, (Z)-3-Hexenil butirato y (E)-3-Hexenil butirato. Los resultados se corresponden con el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento. El simple (\*) asterisco indica que existe significación estadística con un  $p$ -value  $<0,05$ .

### Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030.

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.		X		
ODS2. Hambre cero.	X			
ODS 3. Salud y bienestar.		X		
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.	X			
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.			X	
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.		X		
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.		X		
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.		X		

<b>ODS 12. Producción y consumo responsables.</b>	X			
<b>ODS 13. Acción por el clima.</b>	X			
<b>ODS 14. Vida submarina.</b>				X
<b>ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.</b>		X		
<b>ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.</b>				X
<b>ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.</b>		X		

Entre los papeles de la biotecnología vegetal destacan el desarrollo de alternativas sostenibles a la emergencia agroalimentaria y climática, centrándonos en este trabajo en intentar solventar la amenaza que suponen los patógenos para los cultivos. Por ello, el presente Trabajo de Fin de Grado contribuye al desarrollo y obtención de plantas más productivas y adaptadas a condiciones adversas como el ataque que las plantas sufren ante los patógenos.

En concreto, este TFG tiene un alto grado de relación con los ODS 2, 12 y 13 debido a que se consigue reducir el uso de plaguicidas con el uso de plantas transgénicas resistentes a una infección bacteriana, disminuyendo de esta manera las pérdidas de producción y consiguiendo proveer a la población de más alimentos. Además, el equipo de investigación donde se ha realizado este TFG está dirigido por una mujer, al igual que la directora del presente Trabajo de Fin de Grado, contribuyendo de esta manera al ODS 5 de igualdad de género.