



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y  
Celular de Plantas

Caracterización del papel de los volátiles de hoja verde en  
la respuesta sistémica plantas de tomate infectadas con  
*Pseudomonas syringae*

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de  
Plantas

AUTOR/A: Comerón Tabernero, Sara

Tutor/a: Lisón Párraga, María Purificación

Director/a Experimental: Pérez Pérez, Julia

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



CSIC  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

# Caracterización del papel de los volátiles de hoja verde en la respuesta sistémica de plantas de tomate infectadas con *Pseudomonas syringae*

## TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

**Autora:**

Sara Comerón Tabernero

**Directora experimental:**

Julia Pérez Pérez

**Tutora:**

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

## RESUMEN

Un estudio anterior realizado en el laboratorio demostró que las plantas de tomate emiten de manera diferencial los volátiles de hoja verde (*green leaf volatiles, GLVs*) cuando resisten eficientemente una infección causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) (López-Gresa *et al.*, 2017). Posteriormente, se ha determinado que estos compuestos, y en concreto, los ésteres del (Z)-3-hexenol, promueven la resistencia frente a diversos tipos de patógenos cuando son aplicados como tratamiento exógeno (López-Gresa *et al.*, 2018; Payá *et al.*, 2020, 2024).

En este trabajo, hemos estudiado el papel de los *GLVs* en la respuesta defensiva denominada *ETI* que se activa tras una infección por *Pst* tanto a en el lugar de la infección (local) como en los tejidos distales no infectados (sistémico). Para ello, hemos caracterizado molecular, química y fenotípicamente dos líneas transgénicas de *Solanum lycopersicum* cv. 'Rio Grande' silenciadas por ARNi en el gen *alcohol acil transferasa 1 (AAT1)*, esencial en la síntesis de ésteres del (Z)-3-hexenol.

Los resultados obtenidos demuestran que el silenciamiento del gen *AAT1* genera una mayor susceptibilidad a la infección por *Pst*. Así mismo, en respuesta a una inoculación con dicha bacteria, el silenciamiento provoca una inducción de la ruta de biosíntesis de ácido jasmónico. Por otra parte, los experimentos realizados evidencian que los *GLVs* únicamente se producen a nivel local en el lugar de la infección. Además, hemos observado que tiene lugar el cierre estomático en las hojas distales, tanto superiores como inferiores a la inoculada con la bacteria, abriendo así una nueva dimensión en el estudio de la respuesta defensiva en hojas inferiores a la infectada, que no se encuentran conectadas por los tejidos vasculares. En particular, hemos observado que para dicha respuesta defensiva sistémica se requiere la percepción de los *GLVs*. Por otra parte, los menores niveles de emisión de salicilato de metilo a nivel sistémico en las líneas de silenciamiento sugieren que la enzima *AAT1* podría además ser necesaria para el establecimiento de la resistencia sistémica.

Palabras clave: volátiles de hoja verde; *Pseudomonas syringae*; respuesta sistémica

## ABSTRACT

A previous laboratory study showed that tomato plants differentially emit green leaf volatiles (GLVs) when they efficiently resist an infection caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) (López-Gresa et al., 2017). Subsequently, these compounds, especially (Z)-3-hexenol esters, were found to promote resistance against different types of pathogens when applied as an exogenous treatment (López-Gresa et al., 2018; Payá et al., 2020, 2024).

In this work, we have investigated the role of GLVs in the defence response, termed ETI, which is activated after *Pst* infection both at the site of infection (local) and in distal uninfected tissues (systemic). To this end, we molecularly, chemically and phenotypically characterised two transgenic lines of *Solanum lycopersicum* cv. 'Rio Grande' silenced by RNAi in the *alcohol acyl transferase 1* (*AAT1*) gene, which is essential for the synthesis of (Z)-3-hexenol esters.

The results show that silencing of the *AAT1* gene leads to increased susceptibility to *Pst* infection. Similarly, in response to inoculation with this bacterium, silencing leads to induction of the jasmonic acid biosynthesis pathway. Furthermore, experiments show that GLVs are only produced locally at the site of infection. In addition, we observed that stomatal closure occurs in leaves distal to and above the one inoculated with the bacterium, opening a new dimension in the study of the defence response in leaves below the infected one, which are not connected by vascular tissues. In particular, we observed that the perception of GLVs is required for such a systemic defence response. Moreover, the lower systemic levels of methyl salicylate emission in the silencing lines suggest that *AAT1* enzyme may also be required for the establishment of systemic resistance.

Keywords: green leaf volatiles; *Pseudomonas syringae*; systemic response

## RESUM

Un estudi anterior realitzat al laboratori va demostrar que les plantes de tomaca emeten de manera diferencial els volàtils de fulla verda (*green leaf volatiles*, *GLVs*) quan resisteixen eficientment una infecció causada per *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) (López-Gresa et al., 2017). Posteriorment, s'ha determinat que aquests compostos, i en concret, els èsters del (Z)-3-hexenol, promouen la resistència enfront de diversos tipus de patògens quan són aplicats com a tractament exogen (López-Gresa et al., 2018; Payá et al., 2020, 2024).

En aquest treball, hem estudiat el paper dels *GLVs* en la resposta defensiva denominada *ETI*, que s'activa després d'una infecció per *Pst* tant en el lloc de la infecció (local) com en els teixits distals no infectats (sistèmic). Per a això, hem caracteritzat molecularment, químicament i fenotípicament dues línies transgèniques de *Solanum lycopersicum* cv. 'Rio Grande' silenciades per ARNi en el gen *alcohol acil transferasa 1* (*AAT1*), essencial en la síntesi d'èsters del (Z)-3-hexenol.

Els resultats obtinguts demostren que el silenciament del gen *AAT1* genera una major susceptibilitat a la infecció per *Pst*. Així mateix, en resposta a una inoculació amb aquesta bacteria, el silenciament provoca una inducció de la ruta de biosíntesi d'àcid jasmònic. D'altra banda, els experiments realitzats evidencien que els *GLVs* únicament es produeixen a nivell local en el lloc de la infecció. A més, hem observat que té lloc el tancament estomàtic en les fulles distals, tant superiors com inferiors a la inoculada amb la bacteria, obrint així una nova dimensió en l'estudi de la resposta defensiva en fulles inferiors a la infectada, que no es troben connectades pels teixits vasculars. En particular, hem observat que per a aquesta resposta defensiva sistèmica es requereix la percepció dels *GLVs*. D'altra banda, els menors nivells d'emissió de salicilat de metil a nivell sistèmic en les línies de silenciament suggereixen que la enzima *AAT1* podria a més ser necessari per a l'establiment de la resistència sistèmica.

Paraula clau: volàtils de fulla verda; *Pseudomonas syringae*; resposta sistèmica

# 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).

<b>Objetivos de Desarrollo Sostenible</b>	<b>Alto</b>	<b>Medio</b>	<b>Bajo</b>	<b>No procede</b>
ODS 1. Fin de la pobreza.		X		
ODS 2. 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		
ODS 12. Producción y consumo responsable.	X			
ODS 13. Acción por el clima.	X			
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.	X			
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

La biotecnología vegetal es el fundamental en el desarrollo de numerosas herramientas para luchar contra la emergencia agroalimentaria y climática. Este Trabajo Final de Máster contribuye a ello ya que profundiza en los mecanismos que las plantas activan en respuesta a patógenos, lo cual permitirá desarrollar nuevos sistemas que mejoren su capacidad defensiva.

El presente TFM contribuye de forma destacable a los ODS 2, 12,13 y 15, ya que permite reducir el uso de compuestos químicos contaminantes para controlar los ataques de fitopatógenos. Estos compuestos provocan graves daños en los ecosistemas e incrementan las consecuencias del cambio climático. De igual forma, disminuir su uso mejora la producción agrícola con lo cual facilita el acceso a los alimentos de la población.

Por otra parte, este TFM contribuye al ODS 5 ya que ha sido realizado en un laboratorio liderado por mujeres, y en él han participado tres mujeres como directora, tutora y autora.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda y el apoyo de varias personas a las que debo agradecer su aportación y el tiempo invertido.

Muchas gracias, Puri, por haberme abierto las puertas de tu laboratorio antes de conocerme, por dejarme participar en este proyecto en el que he aprendido tanto y por tu apoyo y confianza cuando parecía que no había más alternativas. Gracias también a Mapi y Teresa, por enseñarme lo interesante que puede llegar a ser la metabolómica y por toda vuestra ayuda en los análisis, he aprendido mucho de vosotras.

A mi directora experimental, Julia, muchas gracias por enseñarme todo desde el principio, por estar disponible para cualquier duda que tuviera y por hacer más amenas las mañanas en el laboratorio. Tu apoyo y tu ayuda han sido fundamentales.

Al resto del laboratorio. Paco, gracias por los consejos y por la ayuda con el diseño de oligos. Ismael y José María, ha sido un placer formar parte de vuestro equipo.

A mis compañeros de laboratorio. Carmen, gracias por tus consejos y tu compañía, los experimentos largos son más cortos contigo. Ene, Cynthia, Marc, Silvia y Miguel gracias por conseguir que ir al laboratorio fuera cada día una nueva experiencia.

Este proyecto se lo debo también a mi madre, por apoyarme y creer en mí siempre, aunque no escoja el camino más fácil, y a mi padre, porque sé que me acompaña en cada paso que doy. Todo lo que he conseguido os lo debo a vosotros y a vuestro apoyo incondicional.

A todos mis amigos de Valencia, vosotros sabéis quienes sois, gracias por conseguir que esta ciudad se convierta también en mi casa. Sé que os llevaré conmigo siempre.

Con esto concluyo una etapa muy importante, pero no es un final. Es el principio de nuevas oportunidades y desafíos que estoy preparada para afrontar con todo lo aprendido.

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	RESPUESTA AL ESTRÉS BIÓTICO .....	1
1.1.1.	<i>Pattern-triggered immunity (PTI)</i> .....	1
1.1.2.	<i>Effector-triggered immunity (ETI)</i> .....	2
1.1.3.	Respuesta sistémica a la infección .....	3
1.1.4.	<i>Pseudomonas syringae</i> .....	4
1.2.	REGULACIÓN ESTOMÁTICA EN LA DEFENSA VEGETAL.....	5
1.2.1.	Regulación estomática en la respuesta frente a <i>Pseudomonas syringae</i> ...	5
1.3.	VOCs IMPLICADOS EN LA DEFENSA VEGETAL .....	6
1.3.1.	Biosíntesis de VOCs .....	6
1.3.2.	Papel de los VOCs en la defensa frente a patógenos .....	9
2.	ANTECEDENTES.....	11
3.	OBJETIVOS .....	12
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1.	MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO .....	13
4.2.	PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO .....	13
4.3.	INFECCIÓN BACTERIANA Y RECOGIDA DE MUESTRA.....	14
4.4.	CONTEO BACTERIANO.....	15
4.5.	ANÁLISIS DE LA APERTURA ESTOMÁTICA.....	15
4.6.	ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO .....	16
4.6.1.	Extracción de ARN .....	16
4.6.2.	Síntesis de ADNc .....	16
4.6.3.	Diseño de oligonucleótidos para RT-qPCR.....	16
4.6.4.	qPCR.....	17
4.7.	ANÁLISIS METABOLÓMICO .....	17
4.7.1.	Cuantificación de ácido salicílico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	17
4.7.2.	Análisis de VOCs por GC-MS.....	18
4.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	19
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
5.1.	FUNCIÓN DE LOS ÉSTERES DE GLVs EN LA RESPUESTA DEFENSIVA DENOMINADA ETI	20
5.1.1.	Las líneas de silenciamiento <i>AAT 1.1</i> y <i>AAT 13.1</i> presentan una expresión reducida del gen <i>AAT1</i> .....	20



5.1.2.	Las líneas de silenciamiento <i>AAT 1.1</i> y <i>AAT 13.1</i> tienen alterada la ruta LOX .....	21
5.1.3.	El silenciamiento del gen <i>AAT1</i> altera los niveles de SA y sus derivados ..	23
5.1.4.	Las líneas <i>AAT 1.1</i> y <i>AAT 13.1</i> no emiten <i>GLVs</i> .....	25
5.1.5.	El silenciamiento del gen <i>AAT1</i> reduce la respuesta defensiva frente a <i>Pst</i> .....	28
5.2.	FUNCIÓN DE LOS ÉSTERES DE <i>GLVs</i> EN LA RESPUESTA SISTÉMICA A UNA INFECCIÓN CON <i>Pst</i> .....	29
5.2.1.	Los <i>GLVs</i> inducen el cierre estomático a nivel sistémico tras una infección local.....	29
5.2.2.	La infección con <i>Pst</i> provoca un cambio en el perfil de volátiles solo a nivel local.....	31
5.2.3.	Los niveles de MeSA a nivel sistémico no se modifican tras una infección local con <i>Pst</i> en las líneas <i>AAT 1.1</i> y <i>AAT 13.1</i> .....	33
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	35
7.	CONCLUSIONES .....	37
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	38
9.	ANEXOS .....	I

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAT: Alcohol acil transferasa

ABA: Ácido abscísico

ADH: Alcohol deshidrogenasa

ANOVA: Análisis de la varianza

Avr: Factor de avirulencia

UFC: Unidades formadoras de colonias

COR: Coronatina

DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño

EFR: Receptor de EF-Tu

EF-Tu: Factor de elongación bacteriano Tu

ET: Etileno

*ETI: Effector-triggered immunity*

*ETS: Effector-triggered susceptibility*

*FLS2: Flagellin-sensitive2*

G3P: Glicerol 3-fosfato

GA: Ácido gentísico

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

GLVs: Volátiles de hoja verde

HA: Acetato de (Z)-3-hexenilo

HAMPS: Patrones moleculares asociados a herbívoros

HB: Butanoato de (Z)-3-hexenilo

HiB: Isobutanoato de (Z)-3-hexenilo

HP: Propanoato de (Z)-3-hexenilo

HPL: Hidroperóxido liasa

HR: Respuesta hipersensible

JA: Ácido jasmónico

LOX: Lipooxigenasa

MAMPs: Patrones moleculares asociados a microorganismos

*MAPK: Mitogen activated protein kinases*

MEP: Metileritritol fosfato

MeSA: Salicilato de metilo

MVA: Ácido mevalónico

OA: Ácido orto-anísico

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PCA: Análisis de componentes principales

Pip: Ácido piperónico

*PR: Pathogenesis-related*

*PRRs: Pattern recognition receptors*

*Pst: Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000*

*PTI: PAMP triggered Immunity*

Pto: Gen de resistencia

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados

R: Genes de resistencia

RG: parental 'Rio Grande'

*ROS: Reactive oxygen species*

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

S5H: Salicilato 5-hidroxilasa

SA: Ácido salicílico

*SAR: Systemic acquired resistance*

*VOCs: Volatile organic compounds*

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Modelo en zig-zag del sistema defensivo de las plantas</b> .....	3
<b>Figura 2. Diagrama del ciclo infectivo de <i>P. syringae</i></b> .....	4
<b>Figura 3. Rutas de biosíntesis de los compuestos volátiles</b> .....	7
<b>Figura 4. Ruta de biosíntesis de los GLVs</b> .....	9
<b>Figura 5. Diseño experimental</b> .....	14
<b>Figura 6. Representación de la apertura estomática</b> .....	16
<b>Figura 7. Expresión relativa del gen <i>AAT1</i></b> .....	20
<b>Figura 8. Expresión relativa de los genes <i>TomloxF</i> y <i>HPL</i>, implicados en la síntesis de GLVs, tras una inoculación local con <i>MgCl<sub>2</sub></i> o <i>Pst</i></b> .....	22
<b>Figura 9. Expresión relativa de los genes <i>TomloxD</i>, <i>AOS</i> y <i>TCI21</i>, implicados en la síntesis y señalización por JA, tras una inoculación local con <i>MgCl<sub>2</sub></i> o <i>Pst</i></b> .....	23
<b>Figura 10. Niveles de SA, MeSA y expresión relativa del gen <i>S5H</i> tras una inoculación local con <i>MgCl<sub>2</sub></i> o <i>Pst</i></b> .....	24
<b>Figura 11. Scores plot del PCA basado en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango m/z de 35 a 250 g·mol<sup>-1</sup> en la cuarta hoja de plantas <i>RG</i>, <i>AAT 1.1</i> y <i>AAT 13.1</i>, 24 horas después de una inoculación local con <i>Pst</i></b> .....	27
<b>Figura 12. Heatmap de la emisión de VOCs implicados en la ruta de los GLVs en la cuarta hoja de plantas <i>RG</i>, <i>AAT 1.1</i> y <i>AAT 13.1</i>, 24 horas después de una inoculación local con <i>MgCl<sub>2</sub></i> (<i>Mock</i>) o <i>Pst</i></b> .....	27
<b>Figura 13. Respuesta defensiva inducida por <i>Pst</i> en las líneas <i>AAT 1.1</i> y <i>AAT 13.1</i></b> .....	29
<b>Figura 14. Ratio de apertura estomática medida en la quinta y tercera hoja tras la inoculación local de la cuarta hoja con <i>MgCl<sub>2</sub></i> o <i>Pst</i> en plantas <i>RG</i>, <i>AAT 1.1</i> y <i>AAT 13.1</i></b> .....	30
<b>Figura 15. Scores plot del PCA basado en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango m/z de 35 a 250 g·mol<sup>-1</sup> en la tercera, la cuarta hoja y la quinta hoja de plantas <i>RG</i>, 24 horas después de una inoculación local en la cuarta hoja con <i>Pst</i></b> .....	32
<b>Figura 16. Scores plot de los PCA basados en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango m/z de 35 a 250 g/mol, obtenidos de la quinta hoja y la tercera hoja de plantas <i>RG</i>, <i>AAT 1.1</i> y <i>AAT 13.1</i>, 24 horas después de una inoculación local en la cuarta hoja con <i>Pst</i></b> .....	32
<b>Figura 17. Niveles de butirato de (Z)-3-hexenilo (HB) en la quinta y tercera hoja de plantas <i>RG</i>, <i>AAT 1.1</i> y <i>AAT 13.1</i></b> .....	33
<b>Figura 18. Niveles de salicilato de metilo (MeSA) en la quinta y tercera hoja de plantas <i>RG</i>, <i>AAT 1.1</i> y <i>AAT 13.1</i></b> .....	34

- Figura S1. Scores plot del PCA** basado en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango  $m/z$  de 35 a 250  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  en la **cuarta hoja de plantas RG, AAT 1.1 y AAT 13.1, 24 horas después de una inoculación local con  $\text{MgCl}_2$  (Mock)**.....II
- Figura S2. Emisión de (Z)-3-hexenal, 2-penten-1-ol, E-2-hexenal, (Z)-3-hexenol, HP, HB, HA y HiB** en la cuarta hoja de plantas **RG, AAT 1.1 y AAT 13.1**.....III
- Figura S3. Scores plot del PCA** basado en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango  $m/z$  de 35 a 250  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  **en la tercera, la cuarta hoja y la quinta hoja de plantas RG, 24 horas después de una inoculación local en la cuarta hoja con  $\text{MgCl}_2$  (Mock)**.....IV
- Figura S4. Scores plot de los PCA** basado en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango  $m/z$  de 35 a 250  $\text{g}/\text{mol}$  **en la quinta hoja y la tercera hoja de plantas RG, AAT 1.1 y AAT 13.1, 24 horas después de una inoculación local en la cuarta hoja con  $\text{MgCl}_2$  (Mock)**.....IV
- Figura S5. Emisión de HP, HA y HiB** en la quinta y tercera hoja de plantas **RG, AAT 1.1 y AAT 13.1**.....V

# 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la sociedad afronta grandes retos para poder alimentar a una población en continuo crecimiento, al mismo tiempo que se preservan los recursos naturales (García *et al.*, 2020). Esta situación se ve agravada por fenómenos como el cambio climático y la contaminación, los cuáles han provocado un aumento en la incidencia de factores de estrés en las plantas, tanto bióticos como abióticos (Ahuja *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2023). En particular, se ha incrementado la virulencia de los patógenos, tal y como demuestran los datos obtenidos en EE.UU. donde se estiman pérdidas de 220 billones de dólares a causa de estos ataques (Singh *et al.*, 2023).

Por todo ello, es necesario estudiar los mecanismos y compuestos que participan en la defensa de las plantas frente al ataque de patógenos, con el objetivo de desarrollar diferentes estrategias que reduzcan el impacto del estrés biótico y así mejorar la productividad de cultivos de interés agrícola.

## 1.1. RESPUESTA AL ESTRÉS BIÓTICO

Las plantas han desarrollado un sistema inmune complejo, compuesto de múltiples mecanismos que les permiten protegerse frente al ataque de patógenos (Cui *et al.*, 2015). Dicho sistema se representa clásicamente como un modelo en zigzag que consta de varias etapas (*Figura 1*), que describe una «carrera» evolutiva en la que plantas y patógenos desarrollan distintas herramientas para favorecer su propia supervivencia (Jones & Dangl, 2006).

### 1.1.1. *Pattern-triggered immunity (PTI)*

La primera línea defensiva permite a los organismos vegetales reconocer moléculas específicas de los propios patógenos o de la actividad de los mismos denominadas elicitores (Cui *et al.*, 2015). En concreto, este reconocimiento se produce a través de *pattern recognition receptors (PRR)* y desencadena la denominada *PTI*. Los *PRR* son proteínas transmembrana que reconocen patrones moleculares asociados a microorganismos, patógenos, herbívoros o daño (PAMPs, MAMPs, HAMPs o DAMPs) (*Figura 1*) (Jones & Dangl, 2006).

En el caso de *P. syringae* dos de los PAMPs más relevantes son la flagelina, concretamente, el péptido flg22 que es reconocido por el *PRR FLS2*, y el factor de elongación Tu (Ef-Tu), que es identificado por el receptor EFR (Dodds & Rathjen, 2010).

El reconocimiento de elicitores por parte de los *PRR*, y, por tanto, la *PTI*, conlleva la activación de cascadas de proteínas quinasa activadas por mitógeno (*mitogen activated protein kinases, MAPK*) que provocan una reprogramación transcripcional, produciendo así la activación de las defensas basales de las plantas (Dodds & Rathjen, 2010; Ghosh *et al.*, 2019). Además, también

desencadena la producción de flujos de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS), la liberación de lípidos de membrana y la señalización hormonal por ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y ácido salicílico (SA) (Dodds & Rathjen, 2010). Todo ello con el objetivo de activar una respuesta defensiva que impida la expansión del patógeno y en la que se incluyen, entre otros procesos, la producción de proteínas de defensa (*pathogenesis related proteins*, PR) y el cierre estomático (Ghosh *et al.*, 2019).

### 1.1.2. Effector-triggered immunity (ETI)

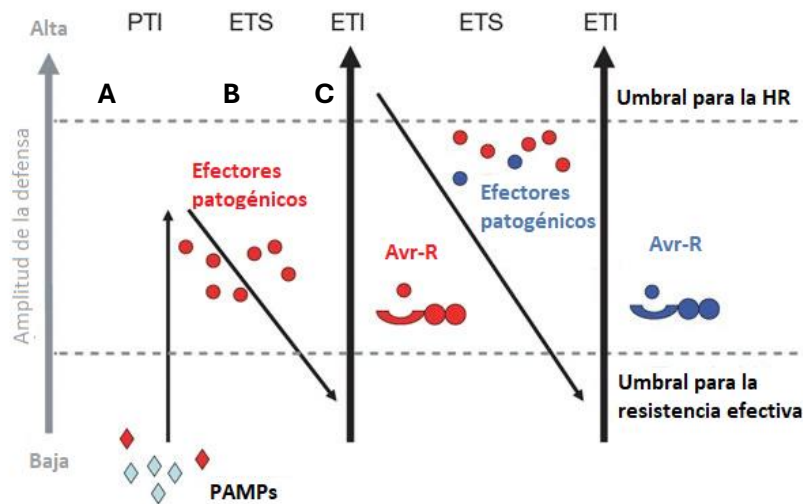
Para hacer frente a la PTI los patógenos han desarrollado diversos mecanismos como la liberación de una serie moléculas denominadas efectores o factores de avirulencia (Avr), que interfieren con la respuesta defensiva y que, por tanto, provocan en la planta una susceptibilidad llamada *effector triggered susceptibility*, (ETS) (Figura 1) (Jones & Dangl, 2006).

En el caso de *P. syringae*, destacan los efectores AvrPto y AvrPtoB cuyo objetivo es bloquear la función de PRR como los receptores quinasa FLS2 y EFR. Esto impide la activación de señales inmunitarias tempranas. (Dodds & Rathjen, 2010).

Por otra parte, las plantas han desarrollado mecanismos que permiten reconocer los efectores patogénicos a través de proteínas NB-LRR codificadas por genes de resistencia (*R*) (Cui *et al.*, 2015). Esta identificación desencadena una respuesta defensiva rápida y robusta, conocida como ETI (Figura 1) (Jones & Dangl, 2006).

Además, de acuerdo al modelo de interacción gen-a-gen (Flor, 1971), el reconocimiento entre el producto del gen bacteriano Avr y del gen de la planta R, se denomina interacción incompatible y activa la ETI (Cui *et al.*, 2015). Este modelo también define otro tipo de interacción, la interacción compatible, que ocurre cuando las plantas no poseen el gen R necesario para combatir el factor de avirulencia, o bien cuando el patógeno no posee el factor de avirulencia. En esta interacción, la planta es incapaz de establecer una respuesta defensiva robusta frente al patógeno, lo que puede llegar a provocar su muerte (Flor, 1971).

Así, la interacción incompatible, y, por tanto, el desarrollo de la ETI conlleva la activación de un mecanismo de muerte celular programada en el lugar de la infección conocido como respuesta hipersensible (HR) (Figura 1) (Ghosh *et al.*, 2019). La ETI también amplifica la reprogramación transcripcional iniciada en la PTI y aumenta las defensas antimicrobianas (Cui *et al.*, 2015).



**Figura 1. Modelo en zigzag del sistema defensivo de las plantas.** (A) Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son reconocidos por PRR (*pattern recognition receptors*) lo cual desencadena la *pattern triggered immunity* (PTI). (B) Algunos patógenos producen efectores que interfieren con la PTI y provocan susceptibilidad en la planta (*effector triggered susceptibility*, ETS). (C) Las plantas poseen proteínas de resistencia (R) capaces de reconocer los efectores patogénicos (Avr). Esta interacción activa la *effector triggered immunity* (ETI) que desencadena la respuesta hipersensible (HR).

Fuente: modificado a partir de (Jones & Dangl, 2006)

### 1.1.3. Respuesta sistémica a la infección

La interacción incompatible no solo induce la respuesta defensiva localmente, sino que también desencadena la producción de señales que son capaces de activar la síntesis de proteínas PR a nivel sistémico en tejidos no infectados (Fu & Dong, 2013). Este fenómeno se denomina *systemic acquired resistance* (SAR) y confiere a los organismos vegetales una memoria inmune o *priming* que se mantiene durante prolongados periodos de tiempo y les ayuda a sobrevivir en un ambiente hostil, cargado de patógenos (Conrath *et al.*, 2015; Fu & Dong, 2013).

Aunque la identidad de la señal móvil que activa específicamente la SAR no está definida, sí que se conocen señales químicas capaces de inducirla como el SA, los monoterpenos, los ácidos azelaico y piperónico (Pip) o el glicerol-3-fosfato (G3P) (Fu & Dong, 2013; Pérez-Pérez *et al.*, 2024; Shan *et al.*, 2018). Estas señales se acumulan a nivel local y sistémico alcanzando su máxima acumulación a partir de las 24 horas posteriores a la infección (Kachroo *et al.*, 2020).

Del mismo modo, los compuestos orgánicos volátiles (*volatile organic compounds*, VOCs) también son capaces de inducir resistencia sistémica frente a patógenos en tejidos no afectados (comunicación intra-planta) o en plantas cercanas (comunicación inter-planta), y entre ellos destacan el salicilato de metilo (MeSA) y los volátiles de hoja verde (*green leaf volatiles*, GLVs) (Hammerbacher *et al.*, 2019; López-Gresa *et al.*, 2018).

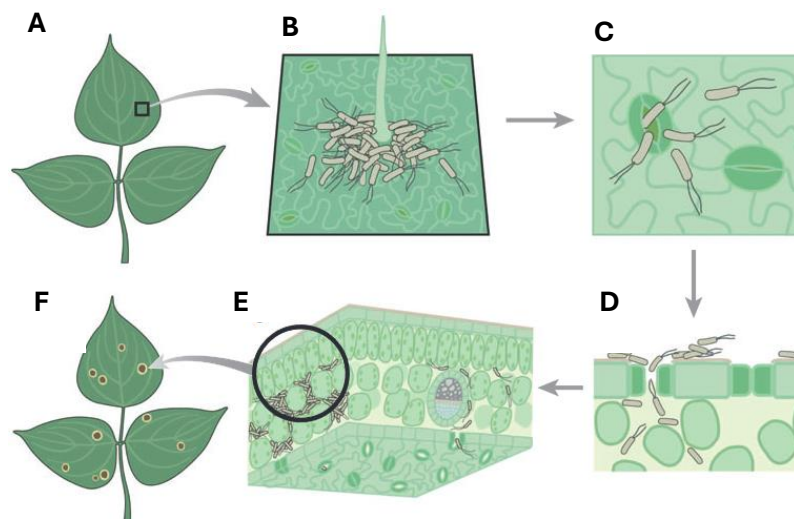


#### 1.1.4. *Pseudomonas syringae*

*P. syringae* es una bacteria gram-negativa en forma de bacilo con flagelos polares. Se trata de un patógeno vegetal que se aisló a partir de plantas enfermas y del que se han identificado más de 60 patovares diferentes (Xin *et al.*, 2018). En conjunto, dichos patovares afectan prácticamente a todos los cultivos económicamente importantes, lo cual convierte a *P. syringae* en uno de los patógenos vegetales más comunes (Xin *et al.*, 2018; Xin & He, 2013).

Esta bacteria posee dos fases de crecimiento interconectadas: la fase epífita o biótrofa, en la cual la bacteria vive en la superficie de los tejidos vegetales, y la fase endófito o necrótrofa, en la que la bacteria penetra en el tejido vegetal a través de heridas o aperturas naturales, como los estomas, y se multiplica en el apoplasto (Figura 2). En todos los casos la enfermedad se produce únicamente durante la fase endófito, cuando *P. syringae* penetra en la planta (Xin *et al.*, 2018).

Dadas sus características, esta bacteria se utiliza como modelo para estudiar las interacciones planta-bacteria. En concreto, *P. syringae* pv. *tomato* cepa DC3000 (*Pst*) es una de las más empleadas debido a su gran repertorio de factores de virulencia y a su capacidad para infectar dos especies modelo, *S. lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana* (Xin & He, 2013). Además, en el caso de *S. lycopersicum* la interacción entre la variedad 'Rio Grande' y *Pst* se utiliza como sistema de estudio del reconocimiento gen-a-gen, y de este modo, de la interacción incompatible, ya que dicha variedad de tomate posee el gen de resistencia *Pto* (Martin *et al.*, 1993).



**Figura 2. Diagrama del ciclo infeccioso de *P. syringae*.** (A) Hojas sanas. (B) Bacterias en la superficie foliar agrupadas alrededor de un tricoma. (C) Bacterias penetrando a través de un estoma abierto. (D) Sección transversal que muestra la colonización del apoplasto. (E) Multiplicación de la bacteria en el apoplasto. (F) Aparición de síntomas visibles: clorosis y necrosis.

Fuente: (Melotto *et al.*, 2008)

## 1.2. REGULACIÓN ESTOMÁTICA EN LA DEFENSA VEGETAL

Los estomas son aperturas naturales formadas por un par de células epidérmicas denominadas células guarda que se sitúan en la parte aérea de la planta (Melotto *et al.*, 2008). Estas estructuras regulan el intercambio de gases entre la planta y el ambiente y controlan la pérdida de agua modificando el tamaño del poro. Debido a ello, el movimiento estomático debe ser una respuesta rápida que responda a diversos estímulos ambientales como la humedad relativa (Melotto *et al.*, 2017).

La inducción de cierre estomático se asocia normalmente con el ácido abscísico (ABA), una hormona que provoca este efecto en respuesta a diversos estreses como la sequía. Además, se han identificado otras moléculas, como el SA o el JA-Ile, que también son capaces de inducirlo (Melotto *et al.*, 2008).

Por otra parte, los estomas constituyen la principal vía de entrada de patógenos al apoplasto, por lo que es necesario regular la apertura estomática para restringir el desarrollo de enfermedades. Sin embargo, los patógenos han desarrollado factores de virulencia que les permiten superar la defensa estomática, lo que les ayuda completar su ciclo infectivo (Melotto *et al.*, 2017).

### 1.2.1. Regulación estomática en la respuesta frente a *Pseudomonas syringae*

El organismo fitopatógeno *Pst* sirve como modelo de estudio de la defensa estomática frente a bacterias debido a la gran diversidad de factores de virulencia que ha desarrollado para sobrepasar esta barrera natural (Melotto *et al.*, 2017; Xin *et al.*, 2018).

Se ha descrito que *Pst* es capaz de estimular la defensa estomática en distintos grados dependiendo de las variaciones naturales de sus PAMPs (Desclos-Theveniau *et al.*, 2012; Zeng & He, 2010). Además, el reconocimiento de dichos PAMPs por *PRR* activa la señalización hormonal mediada principalmente por SA y ABA (Melotto *et al.*, 2017). Ambas hormonas promueven la activación de la defensa estomática (Melotto *et al.*, 2017). Sin embargo, frente a una infección con *P. syringae*, el SA destaca por su implicación en la modulación de respuesta defensiva frente a patógenos de tipo biótrofo (Glazebrook, 2005).

Existen otros compuestos que, producidos en respuesta a una infección con *Pst* y otros patógenos, son capaces de activar rutas que promueven el cierre estomático como, por ejemplo, el butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB), un VOC perteneciente al grupo de los GLVs (López-Gresa *et al.*, 2018; Payá *et al.*, 2020, 2024), o el  $\alpha$ -terpineol de la familia de los monoterpenoides (Pérez-Pérez *et al.*, 2024).

Por otra parte, *Pst* ha desarrollado distintos factores de virulencia que permiten la reapertura de los estomas (Melotto *et al.*, 2017). Uno de estos factores es la coronatina (COR), un análogo del JA-Ile capaz de activar la señalización por JA y de este modo antagonizar la biosíntesis y señalización mediada por SA, lo que le

permite inducir la reapertura estomática y la multiplicación de la bacteria en los tejidos vegetales (Melotto *et al.*, 2006; Xin *et al.*, 2018; Xin & He, 2013).

### 1.3. VOCs IMPLICADOS EN LA DEFENSA VEGETAL

Ante distintos tipos de estreses, tanto bióticos como abióticos, las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios entre los que destacan los VOCs (Dudareva *et al.*, 2013). Este grupo de compuestos simboliza el lenguaje químico de las plantas, el cual utilizan para comunicarse con otros organismos vegetales e incluso con otros miembros del ecosistema (Sharifi *et al.*, 2018).

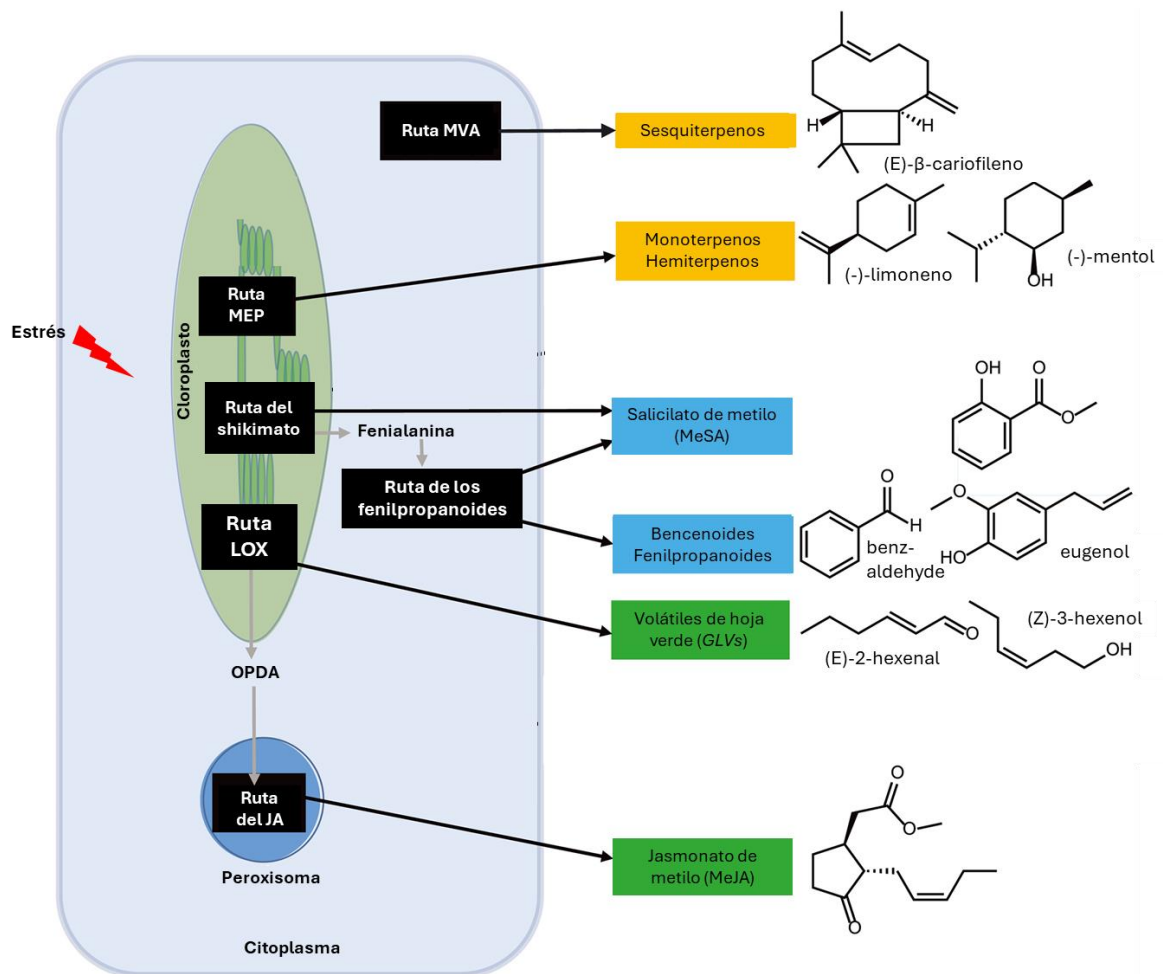
Los VOCs son líquidos de naturaleza lipófila, bajo peso molecular y alta presión de vapor a temperatura ambiente. Estas características les permiten atravesar libremente las membranas celulares y de este modo ser liberados al entorno (Dudareva *et al.*, 2013). Además, se han identificado más de 1700 compuestos de este tipo en diversas especies pertenecientes a un total de 90 familias y 38 órdenes, lo cual pone de manifiesto su importancia en la respuesta vegetal (Picazo-Aragónés *et al.*, 2020).

#### 1.3.1. Biosíntesis de VOCs

A pesar de su diversidad, la biosíntesis de los VOCs se produce fundamentalmente a través de cuatro rutas metabólicas principales: la ruta del shikimato, del ácido mevalónico (MVA), del metileritritol fosfato (MEP) y de las lipooxigenasas (LOX) (Figura 3) (Picazo-Aragónés *et al.*, 2020). De este modo, de acuerdo a su origen estos compuestos pueden dividirse en distintas clases, incluyendo los fenilpropanoides/bencenoides, los terpenoides, y los derivados de ácidos grasos (Dudareva *et al.*, 2013).

##### o *Terpenoides*

Los terpenoides constituyen el grupo más amplio de metabolitos secundarios (Hammerbacher *et al.*, 2019). Estos compuestos se producen mediante dos rutas biosintéticas que convergen en la formación de isopentenil pirofosfato (IPP), el bloque básico de construcción de los terpenoides. Por una parte, la ruta del MEP ocurre en los plastidios y es responsable de la biosíntesis de terpenoides como monoterpenos (C10) y diterpenos (C20). Por otra parte, la ruta del MVA, se lleva a cabo en el citosol y es clave para la biosíntesis de sesquiterpenos (C15) y triterpenos (C30)(Figura 3) (Dudareva *et al.*, 2013).



**Figura 3. Rutas de biosíntesis de los compuestos volátiles.** Terpenos (amarillo), aromáticos (azul), derivados de la ruta de las LOX (verde) se producen en distintos compartimentos.  
Fuente: modificado a partir de (Hammerbacher *et al.*, 2019)

○ *Fenilpropanoides/bencenoides*

La molécula que origina los fenilpropanoides/bencenoides es el aminoácido aromático fenilalanina, que es sintetizado a partir de la ruta del shikimato (Figura 3). Posteriormente, una serie de reacciones químicas catalizadas por enzimas específicas, como la fenilalanina amonio liasa (PAL), convierten este aminoácido en una gran diversidad de compuestos volátiles (Dudareva *et al.*, 2013).

○ *Volátiles de hoja verde y jasmonato de metilo*

Los volátiles derivados de los ácidos grasos incluyen GLVs y el jasmonato de metilo (MeJA), siendo ambos producidos en la ruta de las lipooxigenasas (Figura 3) (Hammerbacher *et al.*, 2019).

Estos compuestos se producen a partir de ácidos grasos poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids, PUFAs*) de dieciocho carbonos (ácido linoleico y ácido  $\alpha$ -linolénico) obtenidos por hidrólisis de la membrana plasmática. Esta reacción es

catalizada por lipasas que actúan en respuesta a diferentes estímulos (Scala *et al.*, 2013).

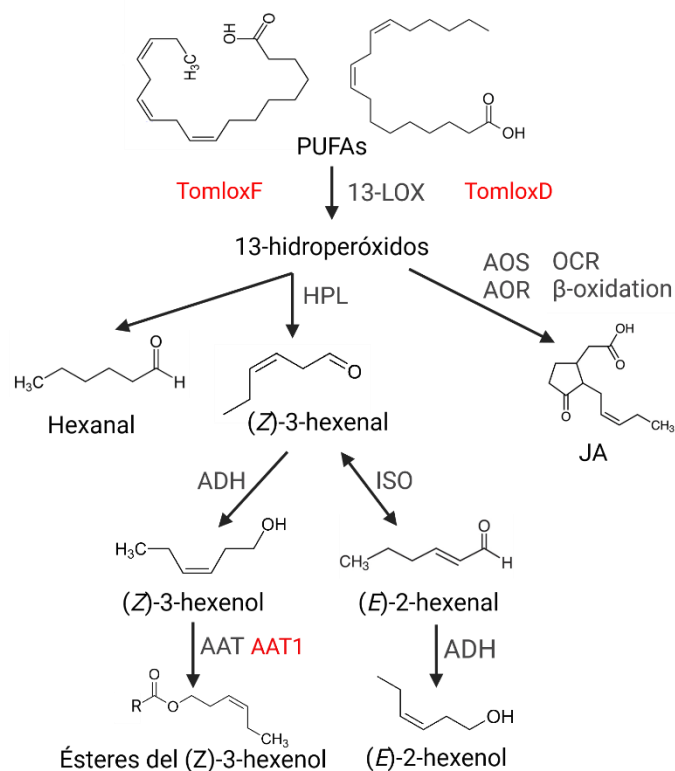
Posteriormente, los *PUFAs* son oxigenados por las enzimas 13-LOX transformándose en 13-hidroperóxidos, los cuales a su vez son sustrato de dos enzimas clave: la aleno óxido sintasa (AOS) y la hidroperóxido liasa (HPL) (*Figura 4*). Si el 13-hidroperóxido es procesado por la AOS, sigue una ruta que conduce a la síntesis de JA y sus derivados. En cambio, si el 13-hidroperóxido es metabolizado por la HPL, se generan los *GLVs*, un grupo formado por compuestos de seis carbonos que incluyen alcoholes, aldehídos y ésteres (Ameye *et al.*, 2018).

La HPL rompe el 13-hidroperóxido para obtener compuestos de seis carbonos, el (Z)-3-hexenal y el hexanal. El primero de ellos es relativamente inestable por lo que se isomeriza a (E)-2-hexenal que, posteriormente, se convierte en (E)-2-hexenol. Del mismo modo, el (Z)-3-hexenal también puede convertirse en su alcohol, el (Z)-3-hexenol, y este a su vez esterificarse, debido a la acción de una enzima alcohol aciltransferasa (AAT), con el ácido acético, propiónico, isobutírico o butírico formando los ésteres acetato de (Z)-3-hexenilo (HA), propionato de (Z)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (Z)-3-hexenilo (HiB) o HB, respectivamente (*Figura 4*) (Ameye *et al.*, 2018).

#### Particularidades de la ruta en *S. lycopersicum*

En tomate se han descrito seis genes codificantes de enzimas lipooxigenasas (*TomloxA-F*), de las cuales tres, *TomloxC*, *TomloxD* y *TomloxF*, son 13-LOX (Mariutto *et al.*, 2011). Estas enzimas juegan un papel esencial en la respuesta frente al estrés biótico ya que *TomloxD* dirige el flujo de 13-hidroperóxido hacia la síntesis de JA y *TomloxF* lo dirige hacia la síntesis de *GLVs*, ambas moléculas defensivas (López-Gresa *et al.*, 2017).

Por otra parte, en esta misma especie la enzima AAT es codificada por cinco genes (Goulet *et al.*, 2015), *SlAAT1-5*. Sin embargo, solo *AAT1* se induce en respuesta a una infección bacteriana tras el establecimiento de la *ETI* (López-Gresa *et al.*, 2017).



**Figura 4. Ruta de biosíntesis de los GLVs.** Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs: ácido linolénico y ácido linoleico) son el sustrato de enzimas 13-lipooxigenasas (13-LOX). Sobre los hidroperóxidos resultantes actúan dos enzimas, la hidroperóxido liasa (HPL) que dirige la síntesis de GLVs y la aleno óxido sintasa (AOS) que activa la síntesis de ácido jasmónico (JA). Posteriormente, una serie de enzimas (alcohol deshidrogenasa (ADH), isomerasa (ISO), alcohol acil transferasa (AAT)) catalizan las reacciones que dan lugar a los GLVs. En rojo se indican las principales enzimas que actúan en esta ruta en *S. lycopersicum* las cuales se detallan en este trabajo.

Fuente: elaboración propia con Biorender (2024, [www.BioRender.com](http://www.BioRender.com))

### 1.3.2. Papel de los VOCs en la defensa frente a patógenos

Los VOCs se sintetizan en respuesta a estreses de todo tipo y su emisión puede ser constitutiva o inducible (Hammerbacher *et al.*, 2019; Sharifi *et al.*, 2018). En concreto, frente al estrés biótico, este tipo de compuestos puede actuar como defensa directa, afectando a la integridad del patógeno, o como defensa indirecta, actuando como señales que activan la respuesta defensiva tanto en la propia planta (comunicación intra-planta) como en plantas vecinas (comunicación inter-planta) (Hammerbacher *et al.*, 2019).

El papel defensivo de estos compuestos se ha estudiado fundamentalmente en la respuesta frente a herbívoros, donde son cruciales tanto por su toxicidad como por su capacidad para atraer predadores del atacante. A pesar de ello, en los últimos años se ha descrito que los VOCs también poseen un rol importante en la protección frente a infecciones con microorganismos fitopatógenos (Hammerbacher *et al.*, 2019).

Por una parte, se ha comprobado que los terpenoides, y en especial los monoterpenos y los sesquiterpenos, son emitidos diferencialmente por los

organismos vegetales en respuesta al ataque de patógenos (Algarra Alarcon *et al.*, 2015; López-Gresa *et al.*, 2017; Pontin *et al.*, 2015). Así pues, recientemente se ha demostrado el papel de los monoterpenos hidroxilados, como el  $\alpha$ -terpineol, en la señalización inmune tanto intra-planta como inter-planta, ya que tratamientos con estos compuestos son capaces de activar la defensa estomática y la acumulación de proteínas *PR* (Pérez-Pérez *et al.*, 2024).

De igual forma, se ha descrito que compuestos pertenecientes a los bencenoides/fenilpropanoides son de gran importancia en la respuesta defensiva frente al estrés biótico. Así por ejemplo, el MeSA es un compuesto capaz de activar resistencia sistémica frente a patógenos en tejidos no infectados (intra-planta) y en plantas cercanas (inter-planta) (Butler *et al.*, 1997; Song & Ryu, 2018). Por su parte, el eugenol es un compuesto fenólico capaz de inducir resistencia frente a patógenos de diverso tipo (Olea *et al.*, 2019; Wang & Fan, 2014).

○ *Papel de los GLVs en la defensa frente a patógenos*

Los GLVs han demostrado ser muy relevantes en la respuesta frente a patógenos (Ameye *et al.*, 2018; Scala *et al.*, 2013). En concreto, algunos aldehídos como el (E)-2-hexenal o el (Z)-3-hexenal incrementan la resistencia frente a hongos (Kishimoto *et al.*, 2005; Zeringue & McCormick, 1989), mientras que ciertos ésteres como el HB son diferencialmente emitidos en plantas de tomate infectadas con *Pst* (López-Gresa *et al.*, 2017). Del mismo modo, se ha comprobado que los GLVs participan en la defensa directa ya que poseen actividad antibacteriana (Nakamura & Hatanaka, 2002).

Un estudio previo realizado en tomate demostró que el HP y el HB son capaces de promover el cierre estomático, la expresión de genes *PR* y una reducción en los síntomas tras la inoculación de *Pst* (López-Gresa *et al.*, 2018). Además, se ha comprobado que el HB es capaz de inducir el cierre estomático en diversas especies pertenecientes a las familias *Solanaceae*, *Leguminosae*, *Brassicaceae* y *Gramineae*, lo cual incrementa la resistencia frente a distintos patógenos (López-Gresa *et al.*, 2018; Payá *et al.*, 2020, 2024).

Estas evidencias ponen de manifiesto la importancia de los GLVs en la comunicación inter-planta (Ameye *et al.*, 2018; Scala *et al.*, 2013). Sin embargo, su papel en la comunicación intra-planta ha sido poco estudiado, existiendo solo evidencias de su rol en la respuesta frente a herbívoros (Scala *et al.*, 2013). En este sentido, destacan una serie de estudios realizados en *Phaseolus lunatus* en los que se demostró que regiones no dañadas de la planta emisora también responden a los VOCs, como el HA, producidos en regiones afectadas por herbívoros (Heil & Bueno, 2007; Heil & Kost, 2006; Kost & Heil, 2006). Esto sugiere que la comunicación intra-planta mediada por VOCs es una forma de señalización más rápida y eficiente que la señalización vascular, lo que permite preparar a los órganos frente a un ataque futuro (Heil & Karban, 2010).

## 2. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se realizó un análisis metabolómico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) que permitió identificar los VOCs implicados en la respuesta defensiva de *S. lycopersicum* cv. 'Rio Grande' portadora del gen de resistencia *Pto* frente a *Pst*. Se determinó el perfil de volátiles emitidos en una interacción tanto de tipo compatible como de tipo incompatible, mediante la inoculación con dos cepas diferentes de *Pst*, virulenta y avirulenta, respectivamente. De este modo, se observó que la activación de resistencia en la planta, conocida como *ETI*, conlleva la emisión diferencial de ésteres del (Z)-3-hexenol, incluyendo el HB, y de algunos monoterpenoides, como el  $\alpha$ -terpineol. Además, se identificó un aumento en la expresión del gen *AAT1* que se relacionó con la liberación de los ésteres del (Z)-3-hexenol y su implicación en la resistencia frente a *Pst* (López-Gresa *et al.*, 2017).

Posteriormente, se analizó el papel del defensivo de los ésteres del (Z)-3-hexenol y se demostró que son capaces de inducir el cierre estomático mediante tratamientos exógenos, lo que impide la entrada de la bacteria y activa la respuesta defensiva de las plantas. Dentro de este grupo, en la resistencia frente a *Pst* destacó el HB, un compuesto que ha sido patentado (PCT/ES2018/070) y licenciado (Químicas Meristem SL) por su actividad frente a numerosos patógenos y en diversos cultivos de interés agrícola (Lisón *et al.*, 2019; López-Gresa *et al.*, 2018; Payá *et al.*, 2020, 2024). Sin embargo, el papel de los ésteres del (Z)-3-hexenol en la comunicación intra- e inter-planta activada tras el establecimiento de *ETI* no se ha definido aún, puesto que no se disponía de plantas transgénicas con niveles alterados de estos VOCs en un fondo genético 'Rio Grande', el cual permite el establecimiento de dicha respuesta defensiva.

Por todo lo expuesto, en el presente trabajo se pretende estudiar el papel de los ésteres del (Z)-3-hexenol en la respuesta defensiva local y sistémica asociada a la *ETI*, mediante la caracterización de líneas de silenciamiento generadas en el fondo 'Rio Grande' que tienen alterada la biosíntesis de estos VOCs.



### 3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estudiar el papel de los ésteres del (Z)-3-hexenol, en cuya biosíntesis participa *AAT1*, en la respuesta defensiva denominada *ETI*, tanto a nivel local como sistémico. Dicha respuesta tiene lugar en plantas de tomate de la variedad 'Rio Grande' (portadora del gen de resistencia *Pto*), tras una infección con la cepa bacteriana avirulenta de *Pst* (portadora del gen de avirulencia *AvrPto*).

Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la función de los ésteres de *GLVs* en la respuesta defensiva denominada *ETI* a nivel local, mediante la caracterización molecular, química y fenotípica y de las líneas transgénicas de tomate de la variedad 'Rio Grande' que silencian el gen *AAT1*.
2. Estudio de la función de los ésteres de *GLVs* en la respuesta defensiva denominada *ETI* a nivel sistémico, mediante la caracterización fenotípica y química de las hojas superior e inferior a una infectada con *Pst* de las líneas transgénicas silencian el gen *AAT1*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

En el presente trabajo se han utilizado tres tipos de plantas de *S. lycopersicum* cv. 'Rio Grande', dos líneas transformadas previamente en el laboratorio con la construcción *RNAi\_AAT* (*AAT 1.1*, *AAT 13.1*) y su parental *RG*. Se trata de líneas *knock-down* silenciadas a nivel postranscripcional por ARNi que presentan unos niveles de expresión reducidos del gen *AAT1*.

Las semillas de las tres líneas fueron esterilizadas en una solución de agua y lejía (1:1) durante 30 minutos. Posteriormente, en campana de flujo laminar se realizaron tres lavados sucesivos con agua destilada estéril durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente. El material esterilizado se sembró en condiciones axénicas en botes de 8 cm de diámetro que contenían 50 mL de medio MS (*Tabla S1*, Anexos) sin kanamicina para la línea *RG* y suplementado con kanamicina para las líneas transformadas *AAT 1.1* y *AAT 13.1*. Los botes se mantuvieron en condiciones de oscuridad en una cámara de cultivo in vitro a 24 °C durante tres días. Después, permanecieron siete días más en dicha cámara de cultivo con un fotoperiodo 16 h/8 h.

Las plántulas se transfirieron a macetas de 12 cm de diámetro con un sustrato compuesto por mezcla de turba con vermiculita (1:1) y fueron cultivadas en invernadero durante cuatro semanas con una temperatura de entre 18-24 °C, un fotoperiodo 16h /8h, una humedad relativa del 50-70 % y riego con solución nutritiva de Hoagland.

### 4.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO

El inóculo de *Pst* se obtuvo en el laboratorio a partir del *stock* almacenado en glicerol a -80 °C. Para ello se prepararon placas Petri de 90 mm de diámetro con 25 mL de medio LB agar suplementado con rifampicina y kanamicina (*Tabla S1*, Anexos) en las que se sembró por estría la bacteria. Dichas placas se mantuvieron en oscuridad durante 48 h a 28 °C.

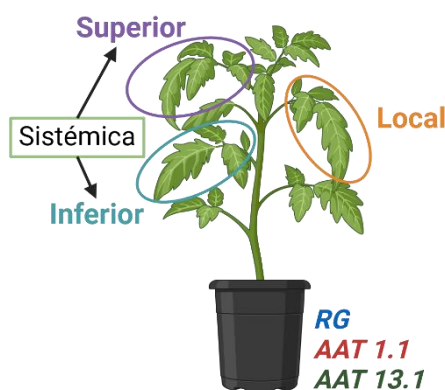
Posteriormente, dos días antes de realizar la infección, se seleccionaron colonias individuales de las placas y se sembraron en cuatro tubos de 50 mL que contenían 3 mL de medio King B líquido suplementado con rifampicina (*Tabla S1*, Anexos). Dichos tubos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 28 °C en condiciones de oscuridad y agitación durante 24 h. A continuación, se prepararon doce tubos de 50 mL con 14 mL de medio King B líquido sobre los que se adicionó 1 mL del inóculo bacteriano a cada uno. Al igual que en el paso anterior, estos tubos se mantuvieron durante 24 h en una cámara de crecimiento a 28 °C en condiciones de oscuridad y agitación. Todo ello permitió un crecimiento óptimo de la bacteria.

El día de la infección, alcanzada una densidad óptica adecuada, se transfirió el contenido de los doce tubos de 50 mL a cuatro tubos de 50 mL que se centrifugaron durante 15 minutos a 4000 rpm. Después, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de cada tubo en 20 mL de  $MgCl_2$  10 mM estéril. Finalmente, se vertió el contenido de los cuatro tubos en un vaso de precipitados para poder determinar la concentración bacteriana por espectrofotometría. Con este objetivo, se midió la absorbancia de una dilución 1:10 del cultivo bacteriano en  $MgCl_2$ , y se calculó el volumen de inóculo que era necesario incorporar en un volumen de 1L de  $MgCl_2$  para obtener una densidad óptica (D.O.) de 0,1, la cual corresponde a una concentración de  $5 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

### 4.3. INFECCIÓN BACTERIANA Y RECOGIDA DE MUESTRA

Para el análisis de la respuesta sistémica se realizó una infección a nivel local por inmersión, sumergiendo la cuarta hoja de plantas de 4 semanas en una solución bacteriana en  $MgCl_2$  (D.O. = 0,1) con el detergente Silwet L-77 al 0,05 % durante 30 segundos. Del mismo modo, en las plantas utilizadas como control se sumergió la cuarta hoja en una solución de  $MgCl_2$  con el detergente Silwet L-77 al 0,05 % durante 30 segundos (Figura 5).

Tras 24 h de infección se recogió material foliar de la hoja infectada y de las hojas inmediatamente superior e inferior a esta, el cual se almacenó a  $-80$  °C para su posterior análisis (Figura 5).



**Figura 5. Diseño experimental.** La cuarta hoja (local, naranja) de plantas de las líneas *RG* (azul oscuro), *AAT 1.1* (rojo) y *AAT 13.1* (verde) fueron inoculadas con una solución de *Pst* en  $MgCl_2$  (*Pst*) o con una solución de  $MgCl_2$  (*Mock*). Se midieron los estomas de la quinta (superior, morado) y la tercera hoja (inferior, azul claro). Se recogió muestra de tejido foliar de la tercera, la cuarta y la quinta hoja.

Fuente: elaboración propia con Biorender (2024, [www.BioRender.com](http://www.BioRender.com))

#### 4.4. CONTEO BACTERIANO

Con el objetivo de analizar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en el material vegetal infectado se realizó una infección por inmersión completa de las plantas, sumergiéndolas desde el ápice hasta la base del tallo en una solución bacteriana en  $\text{MgCl}_2$  10 mM (D.O. = 0,1) con el detergente Silwet L-77 al 0,05% durante 30 segundos.

Pasadas 24 h desde la infección, se extrajeron 3 discos de  $0,95 \text{ cm}^2$  de foliolos infectados de cada una de las plantas utilizando un sacabocados. Dichos discos se depositaron en tubos de 2 mL que contenían  $300 \mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  10 mM estéril. Posteriormente, en cada uno de los tubos se introdujeron 10 bolas de vidrio y se trituró el contenido en el homogeneizador TissueLyser II (Qiagen, Países Bajos). El siguiente paso fue añadir en campana de flujo laminar  $700 \mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  estéril a cada uno de los tubos de 2 mL y homogeneizarlos mediante el uso de vórtex.

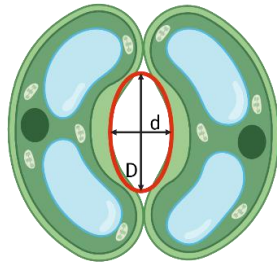
Después, se realizaron diluciones seriadas 1:10 en placas ELISA de 96 pocillos con el material homogenizado hasta alcanzar la dilución  $10^{-6}$ . Esto se realizó para poder sembrar, utilizando bolas de vidrio,  $100 \mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  de cada una de las muestras en placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían 20 mL de medio de cultivo King B agar suplementado con rifampicina (*Tabla S1*, Anexos). Las placas Petri sembradas se incubaron a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  en oscuridad durante 48 h. Pasado ese tiempo, se contó el número de UFC por placa con ayuda de una lupa acoplada a un contador de colonias (Vidrafoc, Selecta, España) y se calculó el número de  $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  y el logaritmo en base diez de dicho número.

$$\log \frac{\text{UFC}}{\text{cm}^2} = \frac{\text{número de colonias} \cdot 10 \cdot 10^{-(\text{dilución})}}{3 \text{ discos} \cdot 0,95 \frac{\text{cm}^2}{\text{disco}}}$$

#### 4.5. ANÁLISIS DE LA APERTURA ESTOMÁTICA

Para medir la apertura estomática se obtuvieron moldes de la parte abaxial de los foliolos, aplicando una fina capa de laca de uñas en el envés de la hoja. Pasados unos 30 segundos desde la aplicación, se colocó cinta adhesiva transparente, se presionó ligeramente y se retiró con suavidad para poder recuperar el molde y depositarlo en un cubreobjetos.

Posteriormente, sobre un portaobjetos se depositó una gota de agua y sobre ella se colocó el cubreobjetos. Las muestras se analizaron por microscopía de campo claro utilizando el microscopio Leica DC5000 (Leica Microsystems S.L.U, Alemania). Se tomaron fotos de diversas regiones de los foliolos y se analizaron con el programa de análisis de imagen ImageJ. Utilizando dicho programa, se midió la elipse formada por la apertura estomática de 50 estomas de cada genotipo y se calculó el ratio correspondiente a la apertura estomática (*Figura 6*).



$$\text{Ratio (apertura estomática)} = \frac{d}{D}$$

**Figura 6. Representación de la apertura estomática.** d y D hacen referencia al diámetro menor y mayor respectivamente.

Fuente: elaboración propia con Biorender (2024, [www.BioRender.com](http://www.BioRender.com))

## 4.6. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

### 4.6.1. Extracción de ARN

El tejido vegetal almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  se trituró en el TissueLyser II (Qiagen, Países Bajos). A partir del polvo resultante se extrajo ARN utilizando el kit de extracción Nucleospin® RNA Plant (Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, en el que ya se incluye el tratamiento con ADNasa.

La concentración de ARN resultante se obtuvo por medida de la absorbancia a 260 nm utilizando el espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) calibrado con agua libre de ARNasa.

### 4.6.2. Síntesis de ADNc

La retrotranscripción (RT) se realizó empleando el kit comercial PrimeScript™ RT reagent kit (Perfect Real Time; Takara Bio Inc., Japón) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. De este modo, cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 10  $\mu\text{L}$  que contenía 1  $\mu\text{g}$  de ARN (el volumen a adicionar dependía de la concentración), 2  $\mu\text{L}$  de tampón (5x PrimeScript Buffer), 0,5  $\mu\text{L}$  de oligo dT Primer 50  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  de enzima transcriptasa reversa (PrimeScript RT enzyme Mix I) y  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q hasta completar dicho volumen. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y después se aplicó un choque térmico durante unos segundos a  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  para inactivar la enzima. Finalmente, las muestras se diluyeron añadiendo 90  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 4.6.3. Diseño de oligonucleótidos para RT-qPCR

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen *AAT1* de *S. lycopersicum*. Para ello, primero se analizó la secuencia del ADNc de dicho gen en la base de datos Phytozome (Solyc08g005770.3.1) con el objetivo de seleccionar una región que no estuviera presente en la construcción *RNAi:AAT*. Posteriormente, se obtuvieron varias parejas de oligonucleótidos que anillaban en dicha región utilizando el programa Primer Express 3.0.1. Por último, se seleccionó la mejor pareja tras analizar las curvas de eficiencia obtenidas por RT-qPCR (Tabla S2, Anexos).

#### 4.6.4. qPCR

La qPCR se llevó a cabo utilizando el reactivo SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, EE.UU.), adicionando las cantidades de H<sub>2</sub>O Milli-Q, SYBR y oligonucleótidos designadas por el fabricante para cada reacción. Se emplearon placas de 96 pocillos MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate (Applied Biosystems, CA, EE.UU.) y en cada pocillo se adicionaron 10 µL de reacción. Finalmente, se selló la placa y se introdujo en el termociclador QuantStudio 3 0,1 mL Block (Applied Biosystems, CA, EE.UU.),

En todos los análisis se utilizó como control interno el gen constitutivo *Actina*. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la *Tabla S2*, Anexos.

### 4.7. ANÁLISIS METABOLÓMICO

#### 4.7.1. Cuantificación de ácido salicílico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para cuantificar el contenido de SA presente en las muestras se pesaron por muestra en tubos de 2 mL 500 mg de tejido foliar machacado y preservado a -80 °C. Posteriormente, en cada uno de los tubos se adicionaron 1,5 mL de metanol con ácido orto-anísico (OA) 0,025 mM que actuará como patrón interno. El contenido de los tubos se homogenizó mediante el uso de vórtex y se agitó con ultrasonidos durante 10 minutos para disgregar completamente el tejido. Después, se centrifugaron los tubos a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se traspasó el sobrenadante a viales de 4 mL. Además, para asegurar una extracción completa se resuspendió el sedimento en 500 µL de metanol con OA 0,025 mM, se centrifugó durante 14 minutos a 12000 rpm y 4 °C y se vertió el sobrenadante sobre los mismos tubos de vidrio de 4 mL. Finalmente, el contenido de los viales se evaporó utilizando una corriente de nitrógeno (N<sub>2</sub>) y una temperatura de 37 °C.

Posteriormente, para determinar el contenido total (libre y glicosilado) de SA en las muestras, sobre cada vial se adicionaron 100 µL de la enzima β-glucosidasa (Honeywell Fluka, NJ, EE.UU.) a una concentración de 10 mg/mL en acetato de sodio 0,1M a pH 4,5, y 900 µL de acetato de sodio 0,1 M a pH 4,5. Estos viales se incubaron toda la noche a 37 °C. Pasado este tiempo, se añadieron sobre cada vial 77 µL de ácido perclórico para detener la reacción, y 2,5 mL de ciclopentano:acetato de etilo (1:1) para favorecer una extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos. Se tomó la fase superior, correspondiente a la fase orgánica, y se transfirió a un nuevo vial donde se evaporó completamente utilizando una corriente de N<sub>2</sub> y una temperatura de 37 °C. Posteriormente, se resuspendió el contenido de los viales en 300 µL de metanol y se filtró empleando una jeringuilla de 1 mL con un filtro millipore de nylon de 13 mm de diámetro y 0,45 µm de poro (Waters™, MA, EE.UU.).

El análisis de los niveles de SA en las muestras se realizó por HPLC transfiriendo 100 µL del extracto anteriormente obtenido a viales Accuform PP vial 0,7 mL (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.). Posteriormente, se inyectaron 30 µL del extracto en una columna de fase reversa Sunfire C18 (5 µm, 4,6 · 150 mm; Waters™, MA, EE.UU.), equilibrada con ácido acético (J. T. Baker, NJ, EE.UU.) al 1 %, utilizando un gradiente de metanol en agua de 0 a 100 % con un flujo constante de 1 mL/min durante 20 minutos. El SA y el OA se identificaron con un detector de fluorescencia Waters 2475 (Waters™, MA, EE.UU.), a una longitud de onda de excitación de 313 nm y una longitud de onda de emisión de 404 nm, y se cuantificaron elaborando curvas patrón utilizando estándares a distintas concentraciones.

#### 4.7.2. Análisis de VOCs por GC-MS

El análisis de VOCs se realizó pesando 100 mg de tejido machacado y almacenado a -80 °C de cada muestra en viales de 7 mL independientes. Del mismo modo, los controles se obtuvieron mezclando material de todas las muestras hasta alcanzar los 100 mg de tejido por vial. Después, en cada vial se adicionaron 1 mL de una disolución de cloruro de calcio saturada (~6 M) y 100 µL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 750 mM a pH 7,5. Los viales se cerraron herméticamente y se agitaron mediante ultrasonidos durante 5 minutos.

Posteriormente, los viales se situaron en un automuestreador CombiPAL (CTC Analytics, Suiza) para proceder a la extracción de los VOCs mediante la técnica de microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME, *Head Space Solid-Phase Microextraction*) (López-Gresa *et al.*, 2017). Este proceso consistió en una incubación de 10 minutos a 50 °C y una extracción de 20 minutos a la misma temperatura en la que la adsorción tuvo lugar en una fibra PDMS/DVB (Supelco, PA, EE.UU.). La desorción de los compuestos adheridos a la fibra tuvo lugar en la zona de inyección del cromatógrafo de gases durante 1 minuto a 250 °C.

Para la detección y cuantificación de VOCs se empleó el cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Agilent, CA, EE.UU.) acoplado al espectrómetro de masas Agilent 5975B Inert XL (Agilent, CA, EE.UU.). Las condiciones del horno fueron: 40 °C durante 2 minutos, una rampa de 5 °C/min hasta llegar a 250 °C y 250 °C durante 5 minutos. Además, el gas portador fue una corriente de helio constante de 1,2 mL/min. La columna utilizada, DB-5 ms, era una columna capilar de 60 metros de longitud y 0,25 mm de diámetro interno con un grosor de fase estacionaria de 1 µm. Por otra parte, el espectrómetro de masas funcionaba en el modo de impacto electrónico, con una energía de activación de 70 eV y una temperatura de fuente de 230 °C, y la adquisición de datos se realizó en el modo *scan* obteniéndose 6 escaneos por segundo en un rango de masa/carga (*m/z*) de 35-250.

Los cromatogramas y los espectros de masas fueron adquiridos y procesados con el programa MassHunter Quantitative Analysis (Agilent, CA, EE.UU.). Además, la identificación de los compuestos se realizó por comparación tanto de los espectros de masas con la librería NIST 05 Mass Spectral library, como de los

tiempos de retención con los de estándares puros proporcionados por el Servicio de Metabolómica del IBMCP.

Para el análisis no dirigido del volátiloma se procesaron los datos obtenidos por GC-MS con el programa MetAlign. Este paso permitió alinear los cromatogramas y eliminar ruido de fondo. Posteriormente, con el programa Excel se realizó una normalización respecto al día y la hora de extracción en el equipo. Para ello, se realizó un análisis ANOVA de una vía sobre los datos de los controles extraídos con el fin de determinar las diferencias existentes entre grupos, y de este modo, poder calcular un factor de corrección adecuado para cada compuesto detectado. Finalmente, tras aplicar los factores de corrección sobre todos los datos se realizó una limpieza de los picos de baja intensidad detectados.

#### 4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En el tratamiento de datos se empleó el programa Excel del paquete Microsoft 365.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism v.8.0.1. Además, las diferencias entre las líneas utilizadas se analizaron mediante los análisis ANOVA de dos vías, ANOVA de una vía y el post hoc *Tukey test*. En todos los casos dichas diferencias se consideraron estadísticamente significativas si P-valor < 0,05.

El análisis de datos multivariable se realizó utilizando los programas MetAlign, Excel y MetaboAnalyst, utilizando en este último la varianza unitaria (UV) como método de escalado en el análisis de componentes principales (PCA).



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

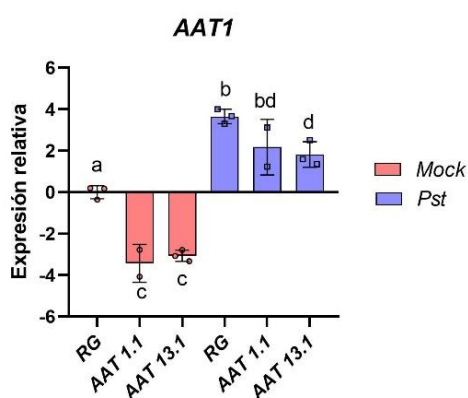
### 5.1. FUNCIÓN DE LOS ÉSTERES DE GLVs EN LA RESPUESTA DEFENSIVA DENOMINADA ETI A NIVEL LOCAL

Con el fin de estudiar la función defensiva de los ésteres del (Z)-3-hexenol en el establecimiento de la *ETI* a nivel local, se llevó a cabo la caracterización molecular, química y fenotípica de las líneas transgénicas de tomate de la variedad Rio Grande que silencian el gen *AAT1* (*AAT 1.1* y *AAT 13.1*), que participa en su ruta de biosíntesis.

#### 5.1.1. Las líneas de silenciamiento *AAT 1.1* y *AAT 13.1* presentan una expresión reducida del gen *AAT1*

Las líneas transgénicas de *S. lycopersicum* cv. 'Rio Grande' *AAT 1.1* y *AAT 13.1* fueron generadas previamente en el laboratorio a partir de una construcción ARNi para silenciar el gen *AAT1*, el cual se induce en respuesta a la infección por *Pst* (López-Gresa *et al.*, 2017). Con el fin de confirmar el silenciamiento génico, dichas plantas fueron infectadas con la bacteria (*Pst*) o bien sumergidas en la solución sin la bacteria (*Mock*) y la expresión del gen *AAT1* fue analizada por RT-qPCR (Figura 7). Para ello, se puso a punto el diseño de oligonucleótidos específicos, de acuerdo a lo indicado en el apartado 3.6.3 de materiales y métodos.

De este modo, se observó que tanto de manera constitutiva (*Mock*) como tras una inoculación con la bacteria (*Pst*) ambas líneas transgénicas presentaban una clara reducción de la expresión del gen *AAT1* respecto al control *RG* (Figura 7). En este último caso, solo la línea transgénica *AAT 13.1* presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a *RG* (Figura 7).



**Figura 7. Expresión relativa del gen *AAT1*** en la cuarta hoja de plantas *RG*, *AAT 1.1* y *AAT 13.1*, 24 horas después de una inoculación local en dicha hoja con  $MgCl_2$  (*Mock*; rosa) o con *Pst* (azul). Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Los niveles de expresión corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo.

Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el *Tukey test* ( $P < 0,05$ ).

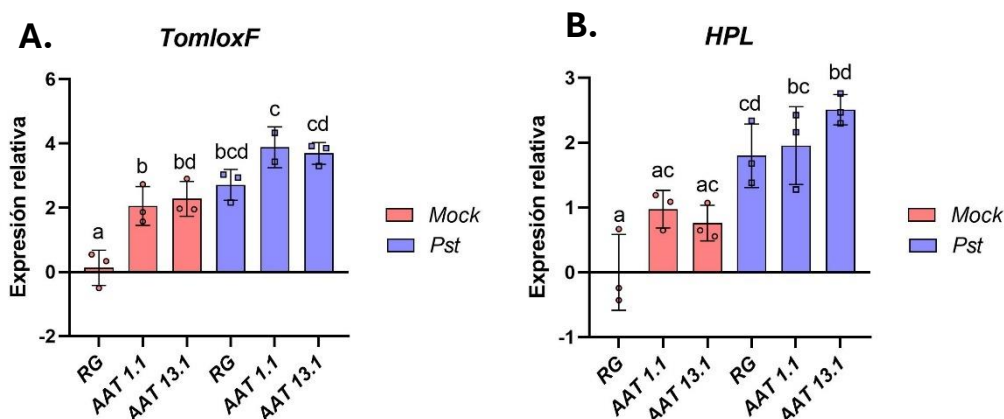
La falta de significación estadística al comparar la línea *RG* con la *AAT 1.1* en la condición *Pst* podría deberse a la relativa inestabilidad de las construcciones de ARNi sobre todo después de producirse varios eventos meióticos, lo cual se ha descrito en la especie modelo *A. thaliana* (T. Wang *et al.*, 2005). De cualquier forma, hemos confirmado que las líneas de silenciamiento generadas presentan una expresión reducida del gen *AAT1* y, por otra parte, disponemos de 2 líneas independientes con niveles distintos de silenciamiento que podrían permitir establecer fenotipos dependientes de la dosis.

#### 5.1.2. Las líneas de silenciamiento *AAT 1.1* y *AAT 13.1* tienen alterada la ruta LOX

Los *GLVs* se emiten de manera diferencial en los organismos vegetales cuando son atacados por hongos, bacterias o herbívoros (Scala *et al.*, 2013). Para que esto ocurra, es necesario un aumento en la expresión de los genes que codifican las enzimas involucradas en su síntesis, destacando *TomloxF*, *HPL* y *AAT1* (Figura 4) (López-Gresa *et al.*, 2017; Tong *et al.*, 2012; Y. Wang *et al.*, 2020). Además, se ha descrito que la alteración de la expresión de *HPL* provoca una reprogramación de la ruta de biosíntesis de *GLVs* en respuesta a distintos estímulos, redirigiendo su sustrato hacia la síntesis de *JA* (Tong *et al.*, 2012; Y. Wang *et al.*, 2020), una hormona que participa en la respuesta defensiva frente a herbívoros y patógenos necrotrofos (Thaler *et al.*, 2012). Por todo ello, en este estudio se decidió analizar los cambios de expresión que ocurren en la ruta LOX al silenciar el gen *AAT1*.

Se analizó la expresión de los genes *TomloxF* (Figura 8A) y *HPL* (Figura 8B), que participan en la ruta de biosíntesis de los *GLVs* (Figura 4). Para ello, se llevó a cabo una RT-qPCR a partir de RNAs de las plantas *RG*, *AAT 1.1* y *AAT 13.1* sin infectar (*Mock*) e infectadas (*Pst*). Se confirmó que ambos genes se inducen significativamente en respuesta a la infección en plantas *RG*. Asimismo, en el caso del gen *TomloxF*, se observó que de manera constitutiva (*Mock*) su expresión fue mayor en las líneas transgénicas, siendo comparable al nivel que de plantas *RG* infectadas con *Pst* (Figura 8A). Del mismo modo, tras una infección con *Pst* los niveles de expresión de dicho gen presentaron un ligero incremento en las plantas transgénicas respecto a *RG*, aunque no fue estadísticamente significativo (Figura 8A).

Por otra parte, en el caso del gen *HPL* se comprobó que, aunque de manera constitutiva (*Mock*) sus niveles de expresión fueron más elevados en plantas transgénicas, en este caso las diferencias no resultaron ser significativas respecto a *RG* (Figura 8B). De igual forma, tras la infección con *Pst* las líneas transgénicas presentaban un ligero incremento en la expresión de *HPL*, aunque no fue estadísticamente significativo (Figura 8B).



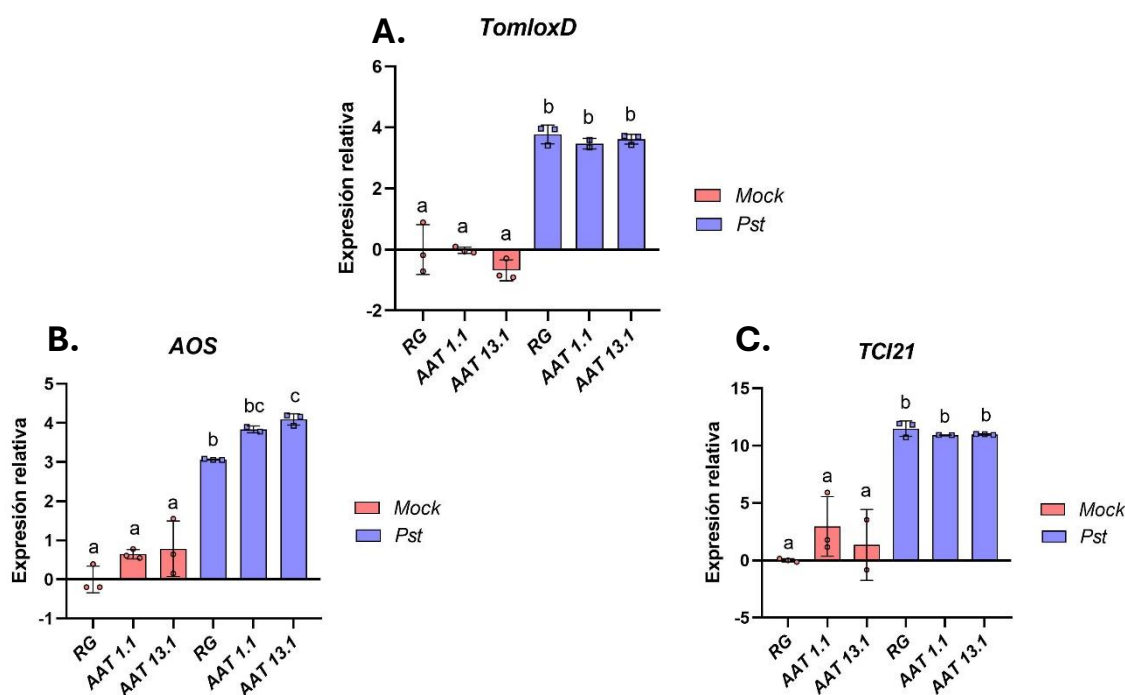
**Figura 8.** Expresión relativa de los genes *TomloxF* y *HPL*, implicados en la síntesis de GLVs, tras una inoculación local con  $MgCl_2$  o *Pst*. En el análisis se utilizó la cuarta hoja de plantas *RG*, *AAT 1.1* y *AAT 13.1* recogidas 24 después de la una inoculación local en dicha hoja con  $MgCl_2$  (*Mock*; rosa) o con *Pst* (azul). Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Los niveles de expresión corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo. Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el *Tukey test* ( $P < 0,05$ ).

Además, se analizó la expresión de los genes *TomloxD* (Figura 9A) y *AOS* (Figura 9B), ambos implicados en la síntesis de JA, así como de *TCI21* (Figura 9C), un marcador de la señalización mediada por JA (Lisón *et al.*, 2006).

Así, se determinó que el gen *TomloxD* se indujo en respuesta a la infección con *Pst*, mostrando un comportamiento similar en las líneas *RG*, *AAT 1.1* y *AAT 13.1* (Figura 9A). Del mismo modo, en el caso del gen *AOS* se observó una inducción de su expresión en respuesta a la infección en las tres líneas, siendo superior la expresión en las líneas transgénicas, aunque solo se apreció una diferencia estadísticamente significativa respecto a *RG* en el caso de la línea *AAT 13.1* (Figura 9B), que se corresponde con la línea que mayor silenciamiento presenta (Figura 7). Finalmente, se evaluó la expresión del gen *TCI21* y se determinó que, aunque su expresión después de la infección se incrementó, los niveles no variaban entre los tres tipos de plantas (Figura 9C).

Se han descrito numerosos ejemplos de genes que participan en mecanismos de retroalimentación tanto positiva como negativa de las rutas metabólicas o de señalización en las que participan (Achard & Genschik, 2009; Chini *et al.*, 2007; de Poel & Van Der Straeten, 2014). Además, como ya se ha comentado anteriormente se ha determinado que el silenciamiento de genes como *HPL* provoca una redirección del sustrato hacia la síntesis de JA (Tong *et al.*, 2012; Y. Wang *et al.*, 2020). Es por ello que los resultados de este estudio indican la existencia de dos eventos complementarios. Por un lado, evidencian un mecanismo que de forma basal (en la condición *Mock*) intenta restaurar los niveles normales de ésteres del (Z)-3-hexenol aumentando la síntesis de compuestos precursores, lo cual se

observa en la mayor expresión de *TomloxD* y *HPL* (Figura 8). Por otro lado, nuestros resultados indican que en respuesta a una infección se redirige el flujo de metabolitos hacia la producción de JA y sus derivados (Figura 9B).



**Figura 9. Expresión relativa de los genes *TomloxD*, *AOS* y *TCI21*, implicados en la síntesis y señalización por JA, tras una inoculación local con  $MgCl_2$  o *Pst*.** En el análisis se utilizó la cuarta hoja de plantas RG, AAT 1.1 y AAT 13.1 recogidas 24 después de la una inoculación local en dicha hoja con  $MgCl_2$  (*Mock*; rosa) o con *Pst* (azul). Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Los niveles de expresión corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo.

Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el *Tukey test* ( $P < 0,05$ ).

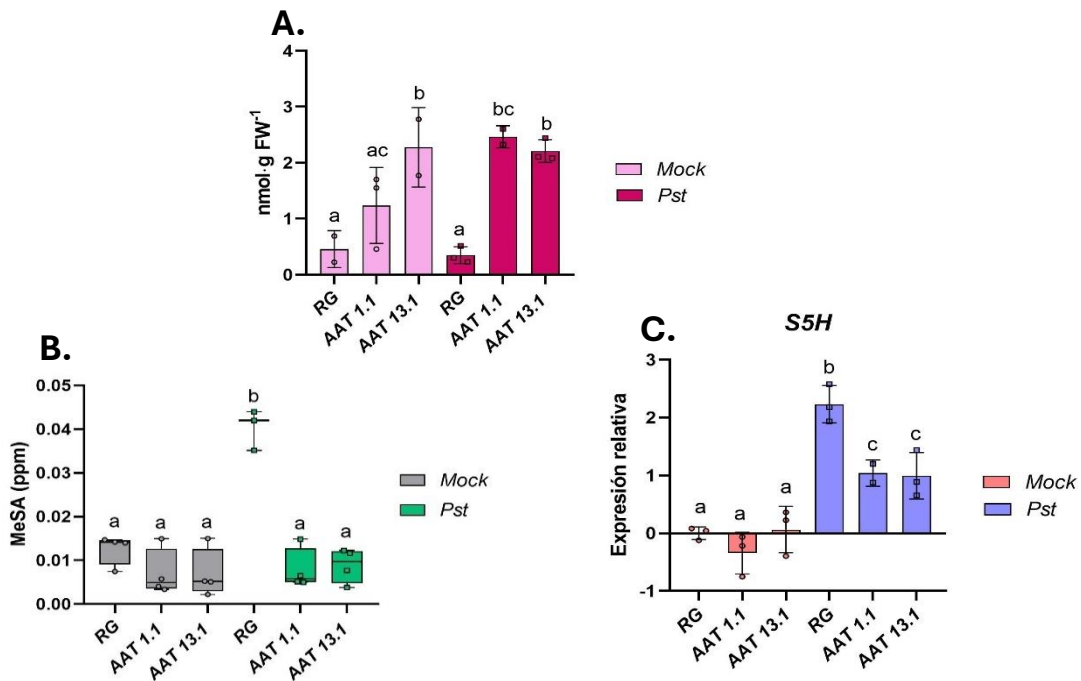
### 5.1.3. El silenciamiento del gen *AAT1* altera los niveles de SA y sus derivados

El SA es una hormona fundamental en la resistencia frente a patógenos, tanto a nivel local como sistémico. Participa tanto en la *PTI* como en la *ETI*, y es una de las señales clave para activar la *SAR* (Ghosh *et al.*, 2019). De igual forma, frente al ataque de patógenos también es esencial la producción de *VOCs*, como los *GLVs*, que confieren resistencia en partes de la planta no infectadas (Hammerbacher *et al.*, 2019). A pesar de ello, la relación entre la emisión de compuestos volátiles y el SA ha sido poco estudiada. Solo en algunos artículos se ha demostrado que el SA promueve la emisión de compuestos volátiles que activan defensas indirectas frente a insectos (Patt *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2021). En este contexto, decidimos estudiar la posible relación que entre el SA y los *GLVs* en respuesta a una infección bacteriana.

La medida de los niveles de SA total permitió observar que los valores no varían significativamente entre las condiciones *Mock* y *Pst* (Figura 10A), tal y como había sido previamente descrito (López-Gresa et al., 2017). Sorprendentemente, en ambas condiciones se detectaron niveles de SA más elevados en las líneas transgénicas *AAT 1.1* y *AAT 13.1* que en *RG* (Figura 10A).

Además, se evaluó la emisión de MeSA, un derivado del SA, lo cual permitió comprobar que la infección con *Pst* promueve la emisión de este compuesto en plantas *RG*, pero no en las líneas transgénicas (Figura 10B).

Por otra parte, se analizó la expresión del gen *S5H*, el cual codifica la enzima encargada de catabolizar el SA en ácido gentísico (GA) (Payá et al., 2022), un compuesto que es capaz de activar las defensas frente a patógenos (Bellés et al., 2007) (Figura 10C). Así, se observó una inducción de dicho gen tras la infección con *Pst* en las plantas *RG*, que resultó ser menor en las líneas transgénicas (Figura 10C). La menor expresión de *S5H* en *AAT 1.1* y *AAT 13.1* indica que se estaría produciendo una menor conversión de SA en GA en dichas líneas, lo que concuerda con los mayores niveles de SA observados en ellas (Figura 10A).



**Figura 10. Niveles de SA, MeSA y expresión relativa del gen *S5H* tras una inoculación local con  $MgCl_2$  o *Pst*.** (A) Nivel de SA libre en la cuarta hoja de plantas *RG*, *AAT 1.1* y *AAT 13.1*, 24 horas después de una inoculación local en dicha hoja con  $MgCl_2$  (*Mock*; rosa) o con *Pst* (fucsia). (B) Emisión de MeSA en la cuarta hoja de plantas *RG*, *AAT 1.1* y *AAT 13.1*, 24 horas después de una inoculación local en dicha hoja con  $MgCl_2$  (*Mock*; gris) o con *Pst* (verde). (C) Expresión relativa del gen *S5H* en la cuarta hoja de plantas *RG*, *AAT 1.1* y *AAT 13.1*, 24 horas después de una inoculación local en dicha hoja con  $MgCl_2$  (*Mock*; rosa) o con *Pst* (azul). Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Los niveles de expresión corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo.

Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el *Tukey test* ( $P < 0,05$ ).

Estos resultados demuestran que la alteración de la expresión del gen *AAT1*, y, por tanto, de la ruta de los *GLVs*, provoca un incremento en los niveles basales de SA (*Figura 10A*) que no sería suficiente para conferir un fenotipo de resistencia, indicando que el control del cierre estomático juega un papel clave en los procesos defensivos (*Figura 13*). En este sentido, dicho aumento podría deberse a una mayor activación de la muerte celular en las plantas transgénicas, ya que el SA participa en la activación de los programas de muerte celular (Radojičić *et al.*, 2018).

Por otra parte, los niveles reducidos de MeSA y la menor inducción de la expresión del gen *S5H* en respuesta a una infección por *Pst* (*Figura 10B, 10C*) ponen de manifiesto que no se produce una activación efectiva del metabolismo del SA.

#### 5.1.4. Las líneas *AAT 1.1* y *AAT 13.1* no emiten *GLVs*

Los *VOCs* son emitidos en respuesta al estrés biótico, actuando como defensa directa frente al patógeno, o bien como defensa indirecta al promover la resistencia de tejidos no infectados o de plantas próximas (Hammerbacher *et al.*, 2019). En este sentido, se ha demostrado que una interacción incompatible, en la que tiene lugar el establecimiento de la respuesta defensiva denominada *ETI*, genera en las plantas un perfil metabolómico distinto al que se obtiene en una interacción compatible, en la que se desarrolla la enfermedad (López-Gresa *et al.*, 2017). En concreto, en la interacción incompatible entre plantas de tomate *RG* y la bacteria *Pst* es diferencial la emisión de los ésteres del (*Z*)-3-hexenol, lo que sugiere, tal y como han confirmado otros estudios, que estos compuestos juegan un papel fundamental en la inducción de resistencia en tejidos distales y plantas cercanas (López-Gresa *et al.*, 2017, 2018; Payá *et al.*, 2020, 2024).

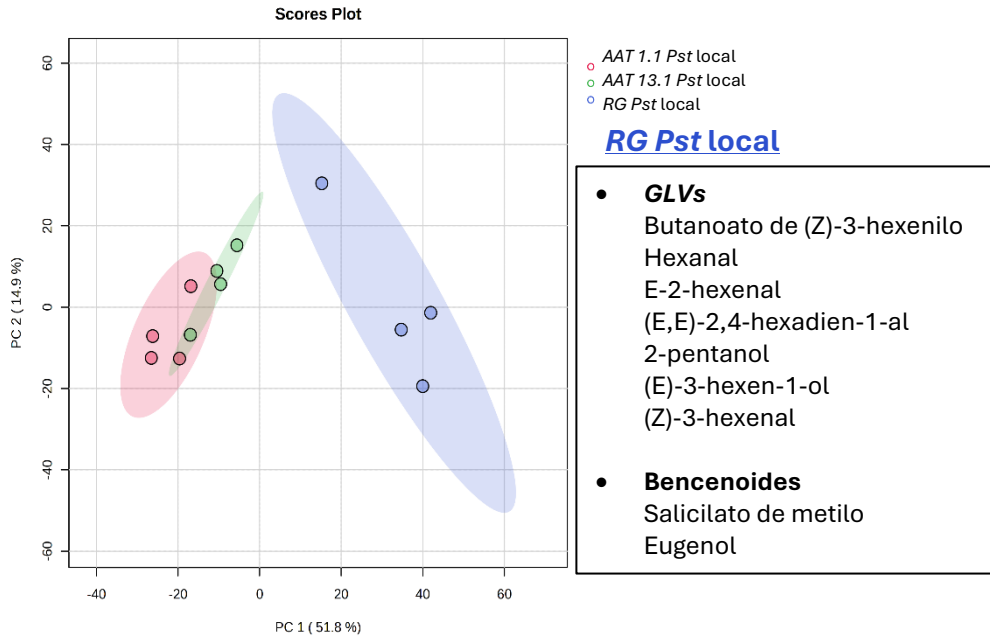
Con el fin de llevar a cabo la caracterización química de las líneas de silenciamiento *AAT 1.1* y *AAT 13.1*, se realizó un análisis metabolómico no dirigido mediante GC-MS para identificar aquellos compuestos volátiles diferencialmente emitidos. Para ello, se realizó una infección a nivel local por inmersión, sumergiendo la cuarta hoja de plantas de 4 semanas en una solución bacteriana (*Pst*) o bien en una solución sin la bacteria (*Mock*) tanto de las plantas *RG* como de las 2 líneas de silenciamiento génico (ver Apartado 4.3 de Materiales y Métodos). Para la observación de las diferencias metabólicas se representaron las muestras en un PCA. El *score plot* del PCA mostró una separación clara entre las líneas transgénicas y *RG* (*Figura 11; Figura S1, Anexos*).

Por otra parte, se identificaron los volátiles diferencialmente emitidos en la línea *RG* respecto a las líneas transgénicas *AAT 1.1* y *AAT 13.1* después de una infección con *Pst*, lo que demostró que el volatilo de *RG* está enriquecido en *GLVs*, principalmente el HB, así como en algunos bencenoides (*Figura 11*). La menor emisión de MeSA confirma los resultados previamente obtenidos (*Figura 10B*). Además, para identificar de manera inequívoca aquellos volátiles que se emiten de forma específica frente a la infección bacteriana, también se identificaron los *VOCs* emitidos en *RG* respecto a las líneas transgénicas después de una inoculación con

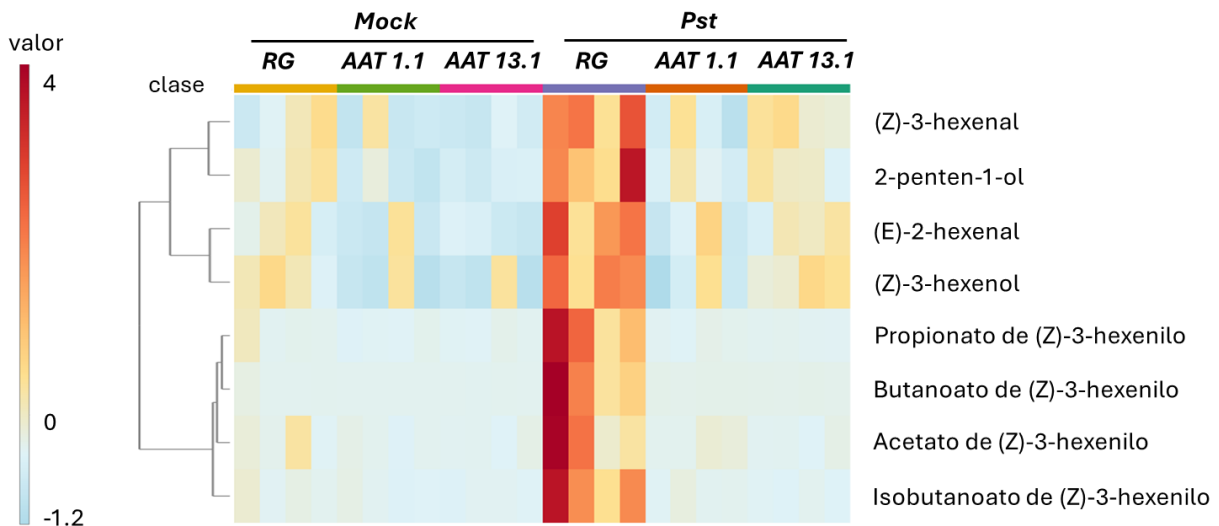
MgCl<sub>2</sub> (*Mock*) (*Figura S1*, Anexos) y se eliminaron de la lista de volátiles asociados a la respuesta frente a la infección aquellos que coincidían en ambas.

Asimismo, se realizó un análisis metabolómico dirigido para evaluar los niveles de emisión de los ésteres del (Z)-3-hexenol y sus precursores en las tres líneas estudiadas (*Figura 12*; *Figura S2*, Anexos). Por una parte, se confirmó que las plantas *RG* producen la emisión diferencial de los ésteres del (Z)-3-hexenol cuando está activada la respuesta defensiva denominada *ETI* inducida por *Pst*, tal y como había sido previamente descrito (López-Gresa *et al.*, 2017). Por otra parte, se determinó que en las líneas *AAT 1.1* y *AAT 13.1* no se induce la emisión de ésteres del (Z)-3-hexenol en respuesta a una infección con *Pst*, y tampoco se observa un aumento en la emisión de sus precursores (*Figura 12*). En este sentido, el agrupamiento jerárquico detectó una separación clara de los compuestos analizados en dos grupos principales: por un lado, los ésteres del (Z)-3-hexenol y, por otro, sus precursores (*Figura 12*). Esto indica que el silenciamiento del gen *AAT1* tuvo un impacto significativo en la producción de estos compuestos.

Un estudio anterior definió los volátiles diferencialmente emitidos en plantas de tomate *wild type* de la variedad ‘Floradade’ y plantas de esta misma variedad en las que se había silenciado el gen *AAT1* (López-Gresa *et al.*, 2018). En él, se determinó que las diferencias encontradas se debían principalmente a los ésteres del (Z)-3-hexenol. Nuestros resultados muestran que la variedad ‘Rio Grande’ se comporta de la misma forma, pero además comprobamos que los precursores de dichos ésteres están disminuidos en las líneas transgénicas. Esto concuerda con otros estudios en los que se ha analizado como se modifican rutas metabólicas específicas tras alterar los pasos finales (Henriquez *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2010; Nakayasu *et al.*, 2020).



**Figura 11. Scores plot del PCA** basado en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango  $m/z$  de 35 a 250  $g \cdot mol^{-1}$  en la **cuarta hoja de plantas RG** (RG Pst local, azul), **AAT 1.1** (AAT 1.1 Pst local, rojo) y **AAT 13.1** (AAT 13.1 Pst local, verde), **24 horas después de una inoculación local con Pst.**



**Figura 12. Heatmap de la emisión de VOCs** implicados en la ruta de los **GLVs** en la **cuarta hoja de plantas RG, AAT 1.1 y AAT 13.1**, **24 horas después de una inoculación local con  $MgCl_2$  (Mock) o Pst.**

La diferencia de color se obtuvo en base a la medida de distancia euclídea. Se utilizó el método *Ward* para agrupar los compuestos.



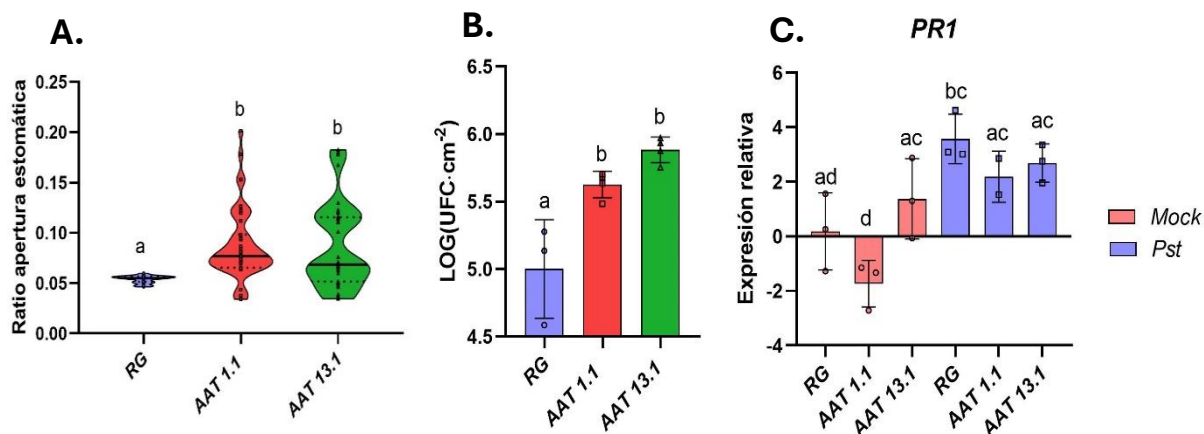
### 5.1.5. El silenciamiento del gen *AAT1* reduce la respuesta defensiva frente a *Pst*

Un estudio anterior demostró que los ésteres del (Z)-3-hexenol son producidos en respuesta a una infección con *Pst* (López-Gresa *et al.*, 2017). Además, se ha comprobado que estos compuestos son capaces de promover la defensa estomática frente a la infección y, por tanto, reducir la capacidad de colonización de la bacteria, ya que los estomas son su principal vía de entrada (López-Gresa *et al.*, 2018; Payá *et al.*, 2024). De igual forma, también se ha descrito que algunos GLVs son capaces de inducir la expresión del gen *PR1* (López-Gresa *et al.*, 2018), un marcador de la infección asociado a la señalización por SA (Saijo & Loo, 2020). Estas evidencias explican el mecanismo de acción de los ésteres del (Z)-3-hexenol como inductores de resistencia frente a *Pst*. Sin embargo, la mayor parte de los estudios se han realizado mediante tratamientos exógenos. Con el fin de confirmar mediante una aproximación genética el papel de estos compuestos en la respuesta defensiva denominada *ETI* en plantas de tomate, se llevó a cabo la caracterización fenotípica y molecular de las líneas transgénicas de tomate de la variedad Rio Grande que silencian el gen *AAT1* (*AAT 1.1* y *AAT 13.1*), con respecto a su parental.

Primero se comprobó la apertura estomática en las líneas *AAT 1.1* y *AAT 13.1*, observando que las líneas transgénicas presentaban los estomas más abiertos de manera significativa (*Figura 13A*). En concordancia con este hecho, dichas plantas presentaron una mayor susceptibilidad a *Pst*, posiblemente debido a una mayor facilidad de colonización bacteriana (*Figura 13B*). Posteriormente, se analizó la expresión del gen *PR1* y se observó un incremento en su expresión en la línea *RG* en la condición *Pst* respecto a la *Mock*, lo que confirmó que la infección se produjo de manera exitosa (*Figura 13C*). Además, se comprobó que no existían diferencias significativas entre las dos líneas y su parental en la condición *Mock*, y que lo mismo ocurría en la infección con *Pst* (*Figura 13C*). En particular, la línea *AAT 13.1*, que fue la que mejor silenciamiento del gen presentó (*Figura 7*), no presentó una inducción significativa del gen *PR1* tras la infección (*Figura 13C*) y mostró una susceptibilidad algo mayor, aunque no significativa. Estos resultados podrían sugerir que existe un efecto dosis del silenciamiento sobre el fenotipo observado.

De este modo, la mayor susceptibilidad de las líneas *AAT 1.1* y *AAT 13.1* ante una infección bacteriana, así como la menor inducción de la expresión de *PR1*, confirman que los GLVs promueven la defensa frente al estrés biótico tal y como se ha descrito en estudios anteriores (Hammerbacher *et al.*, 2019; López-Gresa *et al.*, 2018; Payá *et al.*, 2020, 2024; Scala *et al.*, 2013).

Por tanto, los menores niveles de emisión de GLVs en las líneas *AAT 1.1* y *AAT 13.1* (*Figuras 11* y *12*), la mayor apertura estomática detectada en estas líneas (*Figura 13A*), la menor activación de *PR1* (*Figura 13C*) y su mayor susceptibilidad a la bacteria *Pst* (*Figura 13B*) sugieren que los GLVs tienen una función importante en el establecimiento de la *ETI*.



**Figura 13. Respuesta defensiva inducida por *Pst* en las líneas AAT 1.1 y AAT 13.1.** (A) Ratio de la apertura estomática medida en la cuarta hoja de plantas RG (azul), AAT 1.1 (rojo) y AAT 13.1 (verde). (B) Crecimiento de *Pst* 24 horas después de la inoculación por inmersión de plantas RG (azul), AAT 1.1 (rojo) y AAT 13.1 (verde). (C) Expresión relativa del gen *PR1* en la cuarta hoja de plantas RG, AAT 1.1 y AAT 13.1, 24 horas después de una inoculación local en dicha hoja con  $MgCl_2$  (*Mock*; rosa) o con *Pst* (azul). Los valores de RT-qPCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor del gen actina. Los niveles de expresión corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 3 plantas independientes de un experimento representativo. Se realizaron 3 experimentos independientes. Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el *Tukey test* ( $P < 0,05$ ).

## 5.2. FUNCIÓN DE LOS ÉSTERES DE GLVs EN LA RESPUESTA SISTÉMICA A UNA INFECCIÓN CON *Pst*

Una vez confirmada la función de los ésteres de GLVs en la respuesta defensiva denominada *ETI*, se llevó a cabo el estudio de su función en la respuesta sistémica, mediante la caracterización fenotípica y química de las hojas superior e inferior a una infectada con *Pst*, de las líneas transgénicas silencian el gen *AAT1*.

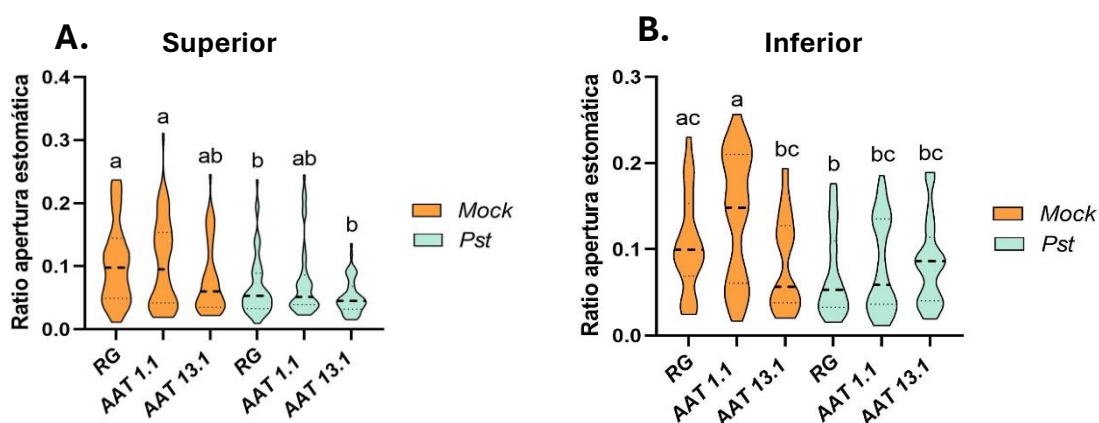
### 5.2.1. Los GLVs inducen el cierre estomático a nivel sistémico tras una infección local

Diversos estudios realizados con herbívoros han demostrado que los VOCs actúan como una señal sistémica que, por su naturaleza volátil, no se transmite a través del sistema vascular, lo que facilita la transferencia de información desde el tejido dañado hacia zonas de la planta no afectadas (Frost *et al.*, 2007; Heil & Bueno, 2007; Karban *et al.*, 2006; Rodriguez-Saona *et al.*, 2009). Esta comunicación, además, contribuye al establecimiento de un *priming* que prepara las partes no dañadas frente a futuros ataques sin requerir una gran inversión de energía. De este modo, entre los posibles responsables de esta señalización intra-planta destacan los GLVs (Heil & Ton, 2008). En este contexto, nuestro estudio busca aportar evidencias de la existencia de una comunicación intra-planta frente al ataque de patógenos en la que los GLVs son fundamentales.

Para ello, se analizó la apertura estomática de plantas *RG*, *AAT 1.1* y *AAT 13.1* en hojas distales, tanto superiores (quinta hoja) como inferiores (tercera hoja), a una hoja inoculada localmente (cuarta hoja) con *Pst* o con una solución de  $MgCl_2$  (*Mock*) (Figura 14). Los resultados obtenidos mostraron que, en plantas *RG*, se induce el cierre estomático en hojas distales al comparar ambas condiciones.

La resistencia sistémica adquirida (*SAR*) asociada a *ETI* se ha asociado clásicamente a tejidos superiores a la hoja infectada, puesto que se contempla que las señales móviles implicadas viajan a lo largo del floema (Fu & Dong, 2013). La detección del cierre estomático en hojas inferiores pone de manifiesto el posible papel de los *VOCs* en la activación de la resistencia sistémica, abriendo una nueva dimensión en el estudio de la resistencia en hojas inferiores a la infectada.

Asimismo, hemos observado que en las líneas transgénicas el cierre estomático en las hojas superior e inferior de una hoja infectada (*Pst*) es menos evidente, ya que se pierde la significación estadística al compararlas con las hojas superior e inferior a una no infectada (*Mock*) (Figura 14). Como ya se ha comentado anteriormente, los ésteres del (Z)-3-hexenol se emiten de manera diferencial tras la inoculación con *Pst*, y son capaces de inducir el cierre estomático de forma independiente a la señalización por *SA*, lo que promueve la resistencia frente a un amplio rango de patógenos (López-Gresa *et al.*, 2017, 2018; Payá *et al.*, 2020, 2024). Sin embargo, no se ha determinado si la emisión de estos compuestos en respuesta a una infección local participa en la señalización sistémica, como en el caso de herbívoros (Scala *et al.*, 2013). Nuestros resultados confirman esta hipótesis y suponen un punto de partida para posteriores experimentos en los que se analice el alcance de dicha señalización.



**Figura 14.** Ratio de apertura estomática medida en la quinta (A) y tercera hoja (B) tras la inoculación local de la cuarta hoja con  $MgCl_2$  (*Mock*; naranja) o *Pst* (verde) en plantas *RG*, *AAT 1.1* y *AAT 13.1*, 24 horas después de una inoculación local en dicha hoja con  $MgCl_2$  (*Mock*; naranja) o con *Pst* (verde).

Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el *Tukey test* ( $P < 0,05$ ).

### 5.2.2. La infección con *Pst* provoca un cambio en el perfil de volátiles solo a nivel local

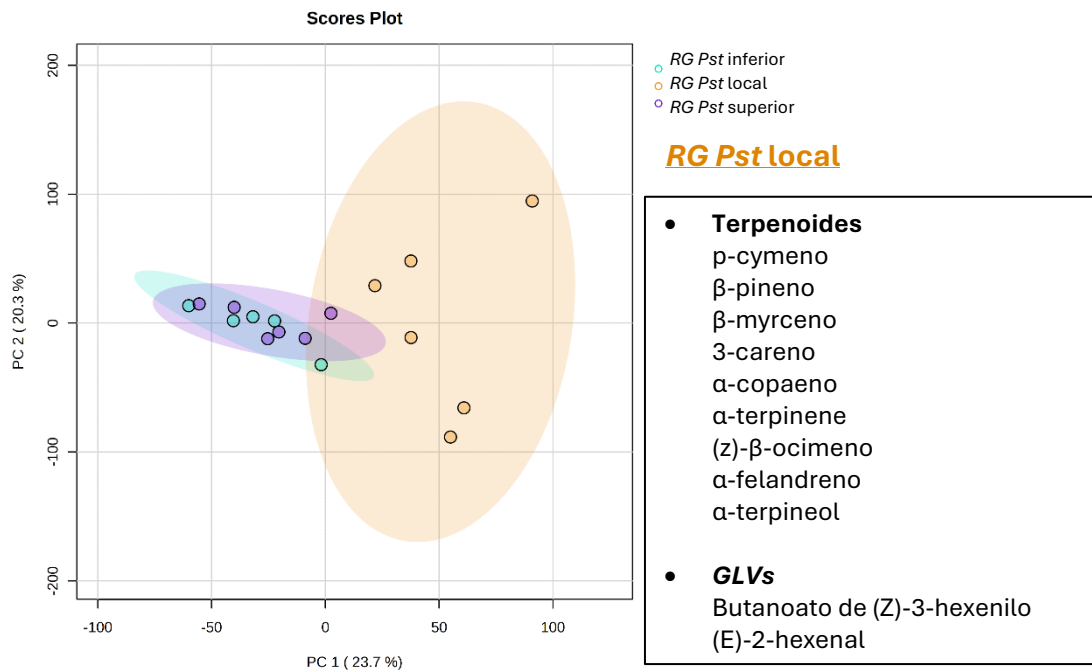
La capacidad de los GLVs para inducir resistencia frente a un amplio espectro de patógenos y herbívoros se ha estudiado mayoritariamente mediante tratamientos exógenos (López-Gresa *et al.*, 2018; Payá *et al.*, 2020; Scala *et al.*, 2013). Además, los estudios en los que se identifica su emisión diferencial en respuesta al estrés biótico solo analizan el tejido directamente afectado (López-Gresa *et al.*, 2017; Scala *et al.*, 2013). Debido a ello, para poder confirmar que los GLVs participan en la comunicación intra-planta es necesario determinar si estos compuestos son emitidos en tejidos distales a la región infectada.

Se analizó el perfil de volátiles en hojas distales (inferior y superior, tercera y quinta hoja respectivamente) y en hojas locales (cuarta hoja) de plantas *RG* inoculadas localmente con una solución de  $MgCl_2$  (*Mock*) (*Figura S3*, Anexos) o con *Pst* (*Figura 15*) mediante un análisis GC-MS. El *score plot* del PCA mostró una separación entre las hojas distales y la hoja local tanto en el caso de la infección (*Figura 15*) como en el tratamiento *Mock* (*Figura S3*, Anexos).

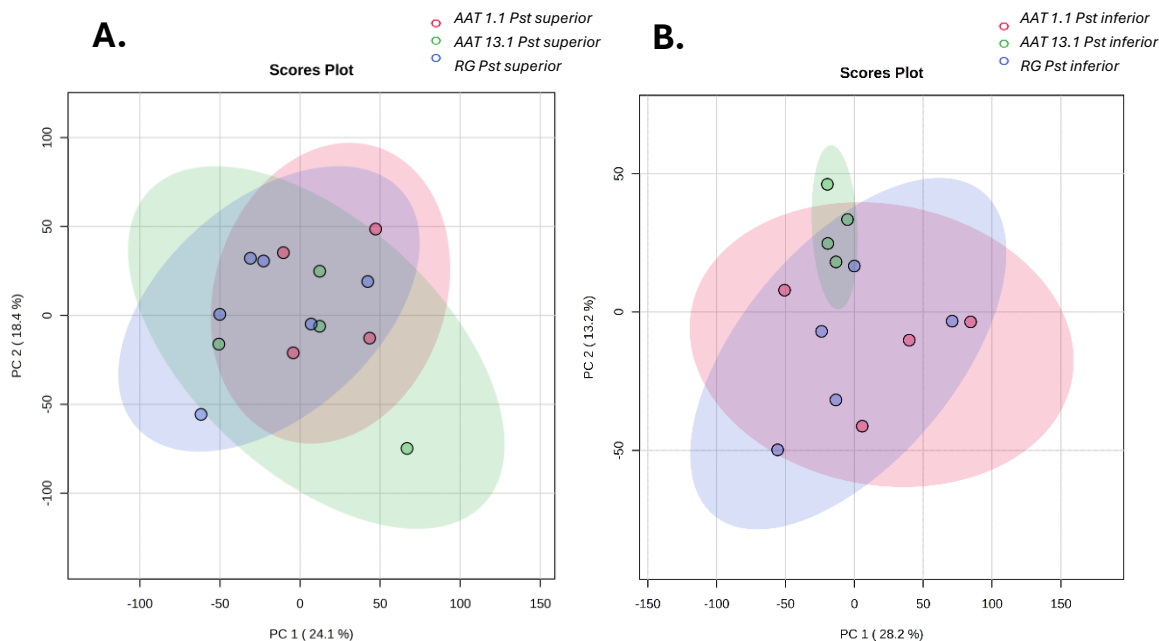
Posteriormente, se analizaron los *loadings plots* para determinar los compuestos diferencialmente emitidos en cada grupo. En el caso de la inoculación con  $MgCl_2$  (*Figura S3*, Anexos) se asumió que los compuestos identificados se debían a diferencias en la edad de las hojas por lo que se utilizaron para diferenciar de manera inequívoca los compuestos diferencialmente emitidos en plantas infectadas localmente con *Pst* (*Figura 15*). De este modo, se determinó que en hojas locales inoculadas con *Pst* se producen una gran variedad de terpenoides, como el  $\alpha$ -terpineol, y aumenta la emisión de GLVs, sobre todo del HB, en comparación con ambas hojas distales (*Figura 15*). Estos resultados indican que la producción de GLVs se estimula de manera local en plantas *RG* infectadas pero no a nivel distal. Asimismo, los VOCs emitidos por las hojas locales coinciden con los previamente publicados (López-Gresa *et al.*, 2017).

Por otra parte, para estudiar el volatiloma de las hojas distales en las líneas transgénicas *AAT 1.1* y *AAT 13.1* se analizaron las diferencias en el perfil de volátiles de hojas superiores e inferiores de las tres líneas, observándose un comportamiento similar al de su parental *RG*, (*Figura S4*, Anexos; *Figura 16*).

Los *scores plots* de los PCA no mostraron separación entre los distintos genotipos ni en hojas superiores ni inferiores tras una inoculación con *Pst* (*Figura 16*), mientras que en la condición *Mock* se observaron diferencias entre los genotipos (*Figura S4*, Anexos). Este hecho demuestra que la infección con *Pst* permite obtener el mismo perfil de volátiles a nivel sistémico en las líneas transgénicas y su parental *RG*.

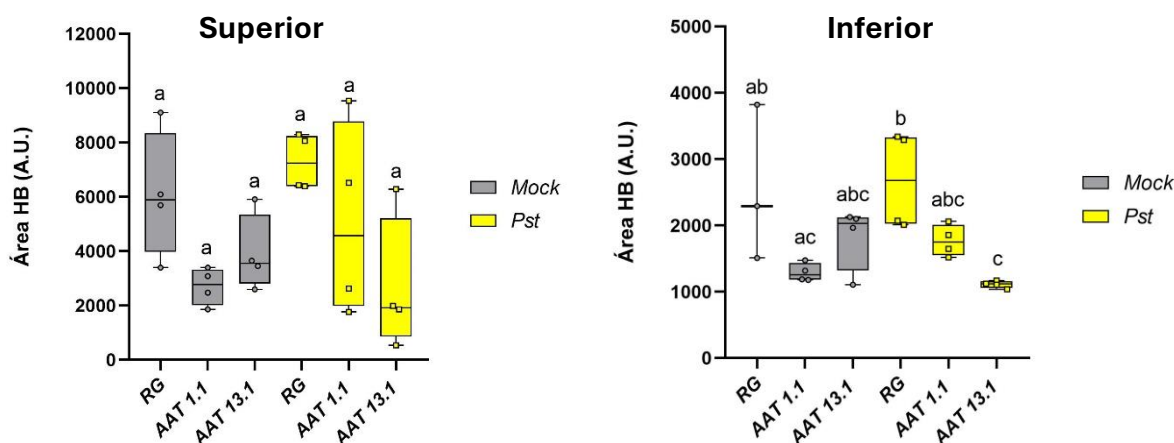


**Figura 15. Scores plot del PCA** basado en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango  $m/z$  de 35 a 250  $g \cdot mol^{-1}$  en la **tercera** (RG Pst inferior, azul), **la cuarta hoja** (RG Pst local, amarillo) y **la quinta hoja** (RG Pst superior, morado) de plantas RG, 24 horas después de una inoculación local en la cuarta hoja con Pst.



**Figura 16. Scores plot de los PCA** basados en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango  $m/z$  de 35 a 250  $g/mol$ , **obtenidos de la quinta hoja** (A, superior) y **la tercera hoja** (B, inferior) de plantas RG (azul), **AAT 1.1** (rojo) y **AAT 13.1** (verde), 24 horas después de una inoculación local en la cuarta hoja con Pst.

Además, también se realizó un análisis dirigido para determinar los niveles de los ésteres del (Z)-3-hexenol (*Figura S5, Anexos; Figura 17*). Tomando como ejemplo el HB, no se observaron diferencias en los niveles de este volátil en hojas superiores e inferiores en ninguna de las condiciones y en ninguno de los genotipos (*Figura 17*).



**Figura 17. Niveles de HB en la quinta (superior) y tercera hoja (inferior) de plantas RG, AAT 1.1 y AAT 13.1**, 24 horas después de una inoculación local en la cuarta hoja con  $MgCl_2$  (Mock; gris) o con *Pst* (amarillo).

Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el *Tukey test* ( $P < 0,05$ ).

Tradicionalmente, la defensa sistémica frente a una infección se ha asociado con moléculas como el SA, el Pip o el G3P. Estos compuestos se distribuyen en la planta a través de los conductos vasculares y desencadenan la SAR (Fu & Dong, 2013). Sin embargo, la identificación de compuestos volátiles como el MeSA o los monoterpenos hidroxilados, esenciales en la inducción de resistencia en tejidos distales o plantas cercanas, ha puesto de manifiesto la importancia de la comunicación a través de señales aéreas (Heil & Karban, 2010; Park *et al.*, 2007; Pérez-Pérez *et al.*, 2024). En este sentido, también se ha demostrado que los GLVs tienen un papel fundamental en la comunicación intra- e inter-planta en respuesta a herbívoros (Matsui & Engelberth, 2022), y, de acuerdo con nuestros resultados, a infecciones bacterianas (*Figura 14*).

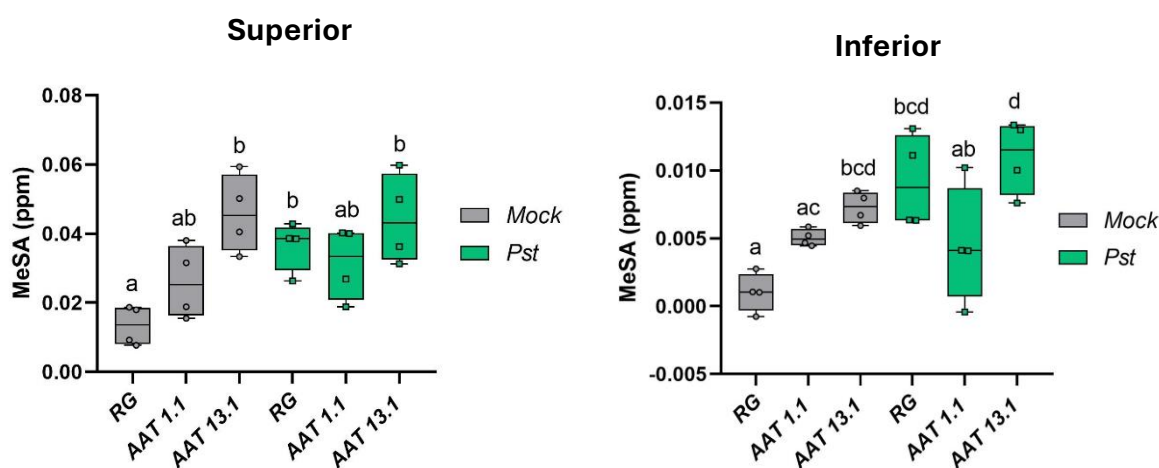
### 5.2.3. Los niveles de MeSA a nivel sistémico no se modifican tras una infección local con *Pst* en las líneas AAT 1.1 y AAT 13.1

El MeSA es un compuesto volátil cuyos niveles se incrementan en respuesta al ataque de patógenos (Shine *et al.*, 2019). En tejidos infectados, el SA se transforma en MeSA para dirigirse hacia tejidos no afectados y plantas cercanas, donde vuelve a convertirse en SA e induce resistencia. De este modo, el MeSA es una señal esencial en la respuesta sistémica, y, por tanto, en la SAR (Park *et al.*, 2007; Shine *et al.*, 2019).

Nuestros resultados anteriores (*Figura 10B*) pusieron de manifiesto que la ausencia de ésteres de (Z)-3-hexenol no permite que los niveles de MeSA en las líneas transgénicas se incrementen localmente (cuarta hoja) tras una infección con *Pst*. Por ello, decidimos analizar los niveles de MeSA en hojas superiores (quinta hoja) e inferiores (tercera hoja) de plantas *RG*, *AAT 1.1* y *AAT 13.1* con el objetivo de determinar cómo afectaba el silenciamiento a los niveles de este compuesto volátil a nivel sistémico (*Figura 18*).

Tanto en hojas superiores como inferiores, la línea *RG* mostró un claro incremento en la emisión de MeSA tras la infección (*Figura 18*). Sin embargo, en las líneas transgénicas los niveles de MeSA no variaron significativamente entre las condiciones *Mock* y *Pst* (*Figura 18*). De igual forma, en la condición *Mock* las líneas transgénicas presentaban unos niveles más elevados de MeSA respecto a *RG*, aunque la diferencia solo era estadísticamente significativa en el caso de la línea *AAT 13.1* (*Figura 18*), que corresponde con la de mayor silenciamiento (*Figura 7*).

Diversos estudios han demostrado la relevancia del MeSA en el establecimiento de la SAR (Butler *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2007). El primero de ellos describió que el MeSA producido por plantas infectadas era capaz de reducir hasta un 30 % el tamaño de las lesiones provocadas por el virus mosaico del tabaco en plantas cercanas (Butler *et al.*, 1997). Posteriormente, una serie de experimentos de injerto realizados en tabaco demostraron que el MeSA se acumulaba en el exudado floemático de tejidos distales, y que para el establecimiento de SAR era necesaria la actividad de una enzima metilasa (Park *et al.*, 2007). De igual forma, en *A. thaliana* también se ha comprobado que silenciar el gen que codifica la metilasa que actúa sobre el SA inhibe el desarrollo de la SAR en respuesta a patógenos como *P. syringae* y *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Liu *et al.*, 2009).



**Figura 18. Niveles de MeSA en la quinta (superior) y tercera hoja (inferior) de plantas *RG*, *AAT 1.1* y *AAT 13.1*, 24 horas después de una inoculación local en la cuarta hoja con  $MgCl_2$  (*Mock*; gris) o con *Pst* (verde).** Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el *Tukey test* ( $P < 0,05$ ).

En este contexto, nuestro trabajo evidencia que el silenciamiento de *AAT1* impide la emisión diferencial de MeSA en las líneas transgénicas en respuesta a la infección, tanto a nivel local (*Figura 10B; Figura 11*) como sistémico (*Figura 18*). Por ello, podemos suponer que en estas líneas no se establecería una respuesta sistémica adecuada y que, por tanto, no se induciría la SAR.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

El presente trabajo de fin de máster pone de manifiesto la importancia de los GLVs en la respuesta defensiva y en la respuesta sistémica de plantas de tomate frente a una infección bacteriana con *Pst*. Los principales resultados indican que en las líneas *AAT 1.1* y *AAT 13.1* los niveles de SA son más altos de forma basal y que, en respuesta a una infección, estas líneas activan la síntesis de JA. Además, demuestran que la percepción de GLVs a nivel sistémico induce el cierre estomático, ya que las líneas transgénicas pierden parte de su capacidad para cerrar los estomas. De igual forma, los resultados obtenidos describen una relación directa entre los GLVs y el SA ya que la ausencia de ésteres del (Z)-3-hexenol inhibe la emisión de MeSA que se produce en respuesta a una infección con *Pst*.

De este modo, como continuación del proyecto en primer lugar se propone determinar si el silenciamiento del gen *AAT1* activa la ruta de señalización del JA tras una infección. Para ello, se analizará la expresión relativa de los genes implicados en la síntesis y percepción de JA 24 horas después de una infección por inmersión completa de la planta y se cuantificarán los niveles de dicho metabolito.

Por otra parte, será de gran importancia analizar cómo afecta el silenciamiento del gen *AAT1* a la señalización sistémica en respuesta a una infección, dado que los niveles de expresión del gen *PR1*, un marcador de la señalización por SA, a nivel local están reducidos en las líneas transgénicas. Así, se propone estudiar la expresión relativa de genes relacionados con la defensa a nivel sistémico tras una infección local. En este sentido, también resulta interesante determinar la capacidad de las líneas *AAT 1.1* y *AAT 13.1* para establecer la SAR, puesto que el MeSA es una señal que participa en el establecimiento de este tipo de respuesta sistémica (Park *et al.*, 2007). Para ello, se llevará a cabo un experimento en el que, quince días después de inocular la bacteria localmente, se inoculará la bacteria en hojas superiores e inferiores y se realizará un conteo bacteriano.

Además, también se propone analizar la comunicación inter-planta utilizando las líneas transgénicas *AAT 1.1* y *AAT 13.1* como plantas emisoras, con el objetivo de comprobar si la ausencia de GLVs disminuye la comunicación inter-planta. Para este fin, se cohabitarán plantas *RG*, *AAT 1.1* o *AAT 13.1* con plantas *RG* receptoras, que serán posteriormente inoculadas con *Pst* y se realizará un conteo bacteriano.



Todos estos experimentos contribuirán a identificar el papel de los *GLVs* en la comunicación intra- e inter-planta a través de señales volátiles, lo cual, unido a las aplicaciones ya descritas de los ésteres del (Z)-3-hexenol (López-Gresa *et al.*, 2018; Payá *et al.*, 2020, 2024), servirá de base para el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas que permitan controlar de manera efectiva una amplia gama de ataques de patógenos.

## 7. CONCLUSIONES

1. El silenciamiento del gen *AAT1* provoca una reprogramación de la ruta LOX en respuesta a una infección con *Pst*. En concreto, este silenciamiento aumenta los niveles de la enzima AOS implicada en la síntesis de JA.
2. Las líneas transgénicas *AAT 1.1* y *AAT 13.1*, en respuesta a una infección bacteriana, presentan menor emisión de GLVs y MeSA, además no incrementan los niveles de SA y sus derivados.
3. Existe una comunicación intra-planta independiente del sistema vascular mediada por VOCs, puesto que la inmunidad estomática se activa también en los tejidos distales inferiores a la infección. Los ésteres del (Z)-3-hexenol y sus precursores parecen tener un papel fundamental en dicha comunicación.
4. En respuesta a una infección, el volatilooma de plantas de tomate se modifica únicamente a nivel local, provocando un incremento en la emisión de GLVs y terpenoides.
5. Los niveles de MeSA no se modifican ni a nivel local ni a nivel sistémico en las líneas transgénicas *AAT 1.1* y *AAT 13.1*, lo que sugiere que *AAT1* es un gen clave para el establecimiento de la SAR.
6. En conjunto, todos nuestros resultados parecen indicar que los GLVs son fundamentales en la comunicación intra-planta que permite establecer una respuesta defensiva robusta frente a una infección con *Pst*.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P., & Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: how GAs shut down DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1085-1092. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERN301>
- Ahuja, I., de Vos, R. C. H., Bones, A. M., & Hall, R. D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*, 15(12), 664-674. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2010.08.002>
- Algarra Alarcon, A., Lazazzara, V., Cappellin, L., Bianchedi, P. L., Schuhmacher, R., Wohlfahrt, G., Pertot, I., Biasioli, F., & Perazzolli, M. (2015). Emission of volatile sesquiterpenes and monoterpenes in grapevine genotypes following *Plasmopara viticola* inoculation in vitro. *Journal of Mass Spectrometry*, 50(8), 1013-1022. <https://doi.org/10.1002/JMS.3615>
- Ameye, M., Allmann, S., Verwaeren, J., Smagge, G., Haesaert, G., Schuurink, R. C., & Audenaert, K. (2018). Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis. *New Phytologist*, 220(3), 666-683. <https://doi.org/10.1111/NPH.14671>
- Bellés, J. M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J., & Conejero, V. (2007). 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>
- Butler, P. M., Clemens, W. A., Crompton, A. W., Hopson, J. A., Krause, D. W., Hahn, G., & Sigogneau-Russell, D. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, 385(6618), 718-721. <https://doi.org/10.1038/385718a0>
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Micol, J. L., & Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666-671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 97-119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 487-511. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>
- De Poel, B. Van, & Van Der Straeten, D. (2014). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: More than just the precursor of ethylene! *Frontiers in Plant Science*, 5, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00640>
- Desclos-Theveniau, M., Arnaud, D., Huang, T. Y., Lin, G. J. C., Chen, W. Y., Lin, Y. C., & Zimmerli, L. (2012). The *Arabidopsis* lectin receptor kinase LecRK-V.5 represses stomatal immunity induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *PLOS Pathogens*, 8(2): e1002513, <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002513>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11, 539-548 <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dudareva, N., Klemplen, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1), 16-32. <https://doi.org/10.1111/NPH.12145>
- Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9, 275-296. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PY.09.090171.001423>
- Frost, C. J., Appel, H. M., Carlson, J. E., De Moraes, C. M., Mescher, M. C., & Schultz, J. C. (2007). Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and

- primes responses against herbivores. *Ecology Letters*, 10(6), 490-498. <https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2007.01043.X>
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 839-863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
- Garcia, S. N., Osburn, B. I., & Jay-Russell, M. T. (2020). One Health for Food Safety, Food Security, and Sustainable Food Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00001>
- Ghosh, S., Malukani, K.K., Chandan, R.K., Sonti, R.V., Jha, G. (2019). How plants respond to pathogen attack: interaction and communication. In: Sopory, S. (eds) *Sensory Biology of Plants*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8922-1\\_20](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8922-1_20)
- 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>
- Goulet, C., Kamiyoshihara, Y., Lam, N. B., Richard, T., Taylor, M. G., Tieman, D. M., & Klee, H. J. (2015). Divergence in the enzymatic activities of a tomato and *Solanum pennellii* alcohol acyltransferase impacts fruit volatile ester composition. *Molecular Plant*, 8(1), 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.007>
- Hammerbacher, A., Coutinho, T. A., & Gershenzon, J. (2019). Roles of plant volatiles in defence against microbial pathogens and microbial exploitation of volatiles. *Plant, Cell & Environment*, 42(10), 2827-2843. <https://doi.org/10.1111/PCE.13602>
- Heil, M., & Bueno, J. C. S. (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5467-5472. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610266104>
- Heil, M., & Karban, R. (2010). Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(3), 137-144. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2009.09.010>
- Heil, M., & Kost, C. (2006). Priming of indirect defences. *Ecology Letters*, 9(7), 813-817. <https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2006.00932.X>
- Heil, M., & Ton, J. (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science*, 13(6), 264-272. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2008.03.005>
- Henriquez, M. A., Soliman, A., Li, G., Hannoufa, A., Ayele, B. T., & Daayf, F. (2016). Molecular cloning, functional characterization and expression of potato (*Solanum tuberosum*) 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase 1 (StDXS1) in response to *Phytophthora infestans*. *Plant Science*, 243, 71-83. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2015.12.001>
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q., & Chen, Z. (2010). Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153(4), 1526-1538. <https://doi.org/10.1104/PP.110.157370>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kachroo, A., & Kachroo, P. (2020). Mobile signals in systemic acquired resistance. *Current opinion in plant biology*, 58, 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.10.004>
- Karban, R., Shiojiri, K., Huntzinger, M., & Mccall, A. C. (2006). Damage-induced resistance in sagebrush: volatiles are key to intra-and interplant communication. *Ecology*, 87(4), 922-930. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87)

- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2005). Volatile C6-aldehydes and allo-cimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 46(7), 1093-1102. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCI122>
- Kloek, A. P., Verbsky, M. L., Sharma, S. B., Schoelz, J. E., Vogel, J., Klessig, D. F., & Kunkel, B. N. (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (coi1) mutation occurs through two distinct mechanisms. *The Plant Journal*, 26(5), 509-522. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2001.01050.X>
- Kost, C., & Heil, M. (2006). Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology*, 94(3), 619-628. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2745.2006.01120.X>
- Lisón, P., López-Gresa, M.P., Rogrigo, I., & Bellés, J.M. (2017) National Patent. Compuesto para la protección de plantas mediante cierre estomático, uso, composición y método relacionados. P201730685. Spain pattend application.
- 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>
- Liu, P. P., Yang, Y., Pichersky, E., & Klessig, D. F. (2009). Altering expression of benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase 1 compromises systemic acquired resistance and PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(1), 82-90. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-1-0082>
- 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, 278706. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01188>
- López-Gresa, M. P., Payá, C., Ozáez, M., Rodrigo, I., Conejero, V., Klee, H., Bellés, J. M., & Lisón, P. (2018). A new role for green leaf volatile esters in tomato stomatal defense against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01855>
- Mariutto, 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(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186%2F1471-2229-11-29>
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D., & Tanksley, S. D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262(5138), 1432-1436. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7902614>
- Matsui, K., & Engelberth, J. (2022). Green Leaf Volatiles—The forefront of plant responses against biotic attack. *Plant and Cell Physiology*, 63(10), 1378-1390. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCAC117>
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126(5), 969-980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>
- Melotto, M., Underwood, W., & Sheng, Y. H. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 101-122. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.121107.104959>
- Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. R., & He, S. Y. (2017). Stomatal defense a decade later. *Plant Physiology*, 174(2), 561-571. <https://doi.org/10.1104/PP.16.01853>
- Nakamura, S., & Hatanaka, A. (2002). Green-leaf-derived C6-aroma compounds with potent antibacterial action that act on both gram-negative and gram-positive bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7639-7644. <https://doi.org/10.1021/jf025808c>

- Nakayasu, M., Akiyama, R., Kobayashi, M., Lee, H. J., Kawasaki, T., Watanabe, B., Urakawa, S., Kato, J., Sugimoto, Y., Iijima, Y., Saito, K., Muranaka, T., Umemoto, N., & Mizutani, M. (2020). Identification of  $\alpha$ -tomatine 23-hydroxylase involved in the detoxification of a bitter glycoalkaloid. *Plant and Cell Physiology*, 61(1), 21-28. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCZ224>
- Nickstadt, A., Thomma, B. P. H. J., Feussner, I., Kangasjärvi, J., Zeier, J., Loeffler, C., Scheel, D., & Berger, S. (2004). The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 5(5), 425-434. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00242.X>
- Olea, A. F., Bravo, A., Martínez, R., Thomas, M., Sedan, C., Espinoza, L., Zambrano, E., Carvajal, D., Silva-Moreno, E., & Carrasco, H. (2019). Antifungal activity of eugenol derivatives against *Botrytis cinerea*. *Molecules*, 24(7), 1239. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24071239>
- Park, S. W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., & Klessig, D. F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318(5847), 113-116. <https://doi.org/10.1126/science.1147113>
- Patt, J. M., Robbins, P. S., Niedz, R., McCollum, G., & Alessandro, R. (2018). Exogenous application of the plant signalers methyl jasmonate and salicylic acid induces changes in volatile emissions from citrus foliage and influences the aggregation behavior of Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*), vector of Huanglongbing. *PLOS ONE*, 13(3), e0193724. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0193724>
- Payá, C., Belda-Palazón, B., Vera-Sirera, F., Perez-Perez, J., Jordá, L., Rodrigo, I., Belles, J. M., López-Gresa, M. P., & Lisón, P. (2024). Signalling mechanisms and agricultural applications of (Z)-3-hexenyl butyrate-mediated stomatal closure. *Horticulture Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1093/HR/UHAD248>
- Payá, C., Pilar López-Gresa, M., Intrigliolo, D. S., Rodrigo, I., Bellés, J. M., & Lisón, P. (2020). (Z)-3-Hexenyl Butyrate Induces Stomata Closure and Ripening in *Vitis vinifera*. *Agronomy*, 10(8), 1122. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10081122>
- Payá C, Minguillón S, Hernández M, Miguel SM, Campos L, Rodrigo I, Bellés JM, López-Gresa MP, Lisón P. (2022). SIS5H silencing reveals specific pathogen-triggered salicylic acid metabolism in tomato. *BMC Plant Biol.*, 22(1), 549. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03939-5>
- Pérez-Pérez, J., Minguillón, S., Kabbas-Piñango, E., Payá, C., Campos, L., Rodríguez-Concepción, M., Espinosa-Ruiz, A., Rodrigo, I., Bellés, M., Pilar López-Gresa, M., & Lisón, P. (2024). Metabolic crosstalk between hydroxylated monoterpenes and salicylic acid in tomato defense response against bacteria. *Plant Physiology*, 195. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae148>
- Picazo-Aragonés, J., Terrab, A., & Balao, F. (2020). Plant volatile organic compounds evolution: transcriptional regulation, epigenetics and polyploidy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 8956. <https://doi.org/10.3390/IJMS21238956>
- Pontin, M., Bottini, R., Burba, J. L., & Piccoli, P. (2015). *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*. *Phytochemistry*, 115(1), 152-160. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2015.02.003>
- Radojčić, A., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Salicylic acid: A double-edged sword for programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 396465. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01133>
- Rodriguez-Saona, C. R., Rodriguez-Saona, L. E., & Frost, C. J. (2009). Herbivore-induced volatiles in the perennial shrub, *Vaccinium corymbosum*, and their role in inter-branch signaling. *Journal of Chemical Ecology*, 35(2), 163-175. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9579-z>
- Saijo, Y., & Loo, E. P. iian. (2020). Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist*, 225(1), 87-104. <https://doi.org/10.1111/NPH.15989>

- Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2013). Green leaf volatiles: a plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17781. <https://doi.org/10.3390/IJMS140917781>
- Shan, L., & He, P. (2018). Pipped at the Post: Pipecolic acid derivative identified as SAR regulator. *Cell*, 173(2), 286–287. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.045>
- Sharifi, R., Lee, S. M., & Ryu, C. M. (2018). Microbe-induced plant volatiles. *New Phytologist*, 220(3), 684-691. <https://doi.org/10.1111/NPH.14955>
- Shi, X., Chen, G., Tian, L., Peng, Z., Xie, W., Wu, Q., Wang, S., Zhou, X., & Zhang, Y. (2016). The salicylic acid-mediated release of plant volatiles affects the host choice of *Bemisia tabaci*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1048. <https://doi.org/10.3390/IJMS17071048>
- Shine, M. B., Xiao, X., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2019). Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science*, 279, 81-86. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2018.01.001>
- Singh, B. K., Delgado-Baquerizo, M., Egidi, E., Guirado, E., Leach, J. E., Liu, H., & Trivedi, P. (2023). Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. *Nature Reviews Microbiology*, 21(10), 640-656. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00900-7>
- Song, G. C., & Ryu, C. M. (2018). Evidence for volatile memory in plants: boosting defence priming through the recurrent application of plant volatiles. *Molecules and Cells*, 41(8), 724-732. <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2018.0104>
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, 17(5), 260-270. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010>
- Tong, X., Qi, J., Zhu, X., Mao, B., Zeng, L., Wang, B., Li, Q., Zhou, G., Xu, X., Lou, Y., & He, Z. (2012). The rice hydroperoxide lyase OsHPL3 functions in defense responses by modulating the oxylipin pathway. *The Plant Journal*, 71(5), 763-775. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2012.05027.X>
- Wang, C., & Fan, Y. (2014). Eugenol enhances the resistance of tomato against tomato yellow leaf curl virus. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), 677-682. <https://doi.org/10.1002/JSFA.6304>
- Wang, T., Iyer, L. M., Pancholy, R., Shi, X., & Hall, T. C. (2005). Assessment of penetrance and expressivity of RNAi-mediated silencing of the *Arabidopsis phytoene desaturase* gene. *New Phytologist*, 167(3), 751-760. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2005.01454.X>
- Wang, Y., Liu, M., Ge, D., Akhter Bhat, J., Li, Y., Kong, J., Liu, K., & Zhao, T. (2020). Hydroperoxide lyase modulates defense response and confers lesion-mimic leaf phenotype in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *The Plant Journal*, 104(5), 1315-1333. <https://doi.org/10.1111/TPJ.15002>
- Xin, X. F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: A model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 473-498. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>
- Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316-328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>
- Yang, J. N., Wei, J. N., & Kang, L. (2021). Feeding of pea leafminer larvae simultaneously activates jasmonic and salicylic acid pathways in plants to release a terpenoid for indirect defense. *Insect Science*, 28(3), 811-824. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12820>
- Zeng, W., & He, S. Y. (2010). A prominent role of the flagellin receptor Flagellin-Sensing 2 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>

Zeringue, H. J., & McCormick, S. P. (1989). Relationships between cotton leaf-derived volatiles and growth of *Aspergillus flavus*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66(4), 581-585.  
<https://doi.org/10.1007/BF02885452>



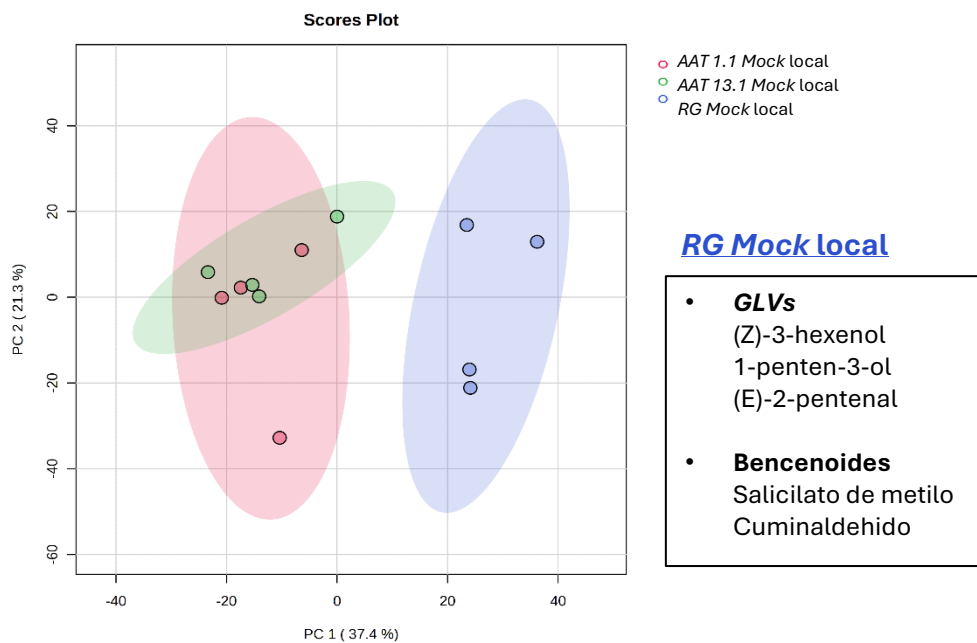
## 9. ANEXOS

	COMPUESTO	CANTIDAD (1L)
Medio MS	Medio Murashige & Skoog	4,4 g
	Sacarosa	10 g
	Agua destilada	1 L
	Phytoagar	8 g
	*Kanamicina (100 mg · mL <sup>-1</sup> )	1 mL
Medio LB agar	LB Agar (Pronadisa)	35 g
	Agua destilada	1 L
	Rifampicina (10 mg · mL <sup>-1</sup> )	10 mL
	Kanamicina (100 mg · mL <sup>-1</sup> )	0,5 mL
Medio King B líquido	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> 1M	5 mL
	Rifampicina (10 mg · mL <sup>-1</sup> )	5 mL
Medio King B agar	King B agar (Pronadisa)	37 g
	Glicerol	15 g
	Agua destilada	1 L
	Rifampicina (10 mg · mL <sup>-1</sup> )	5 mL

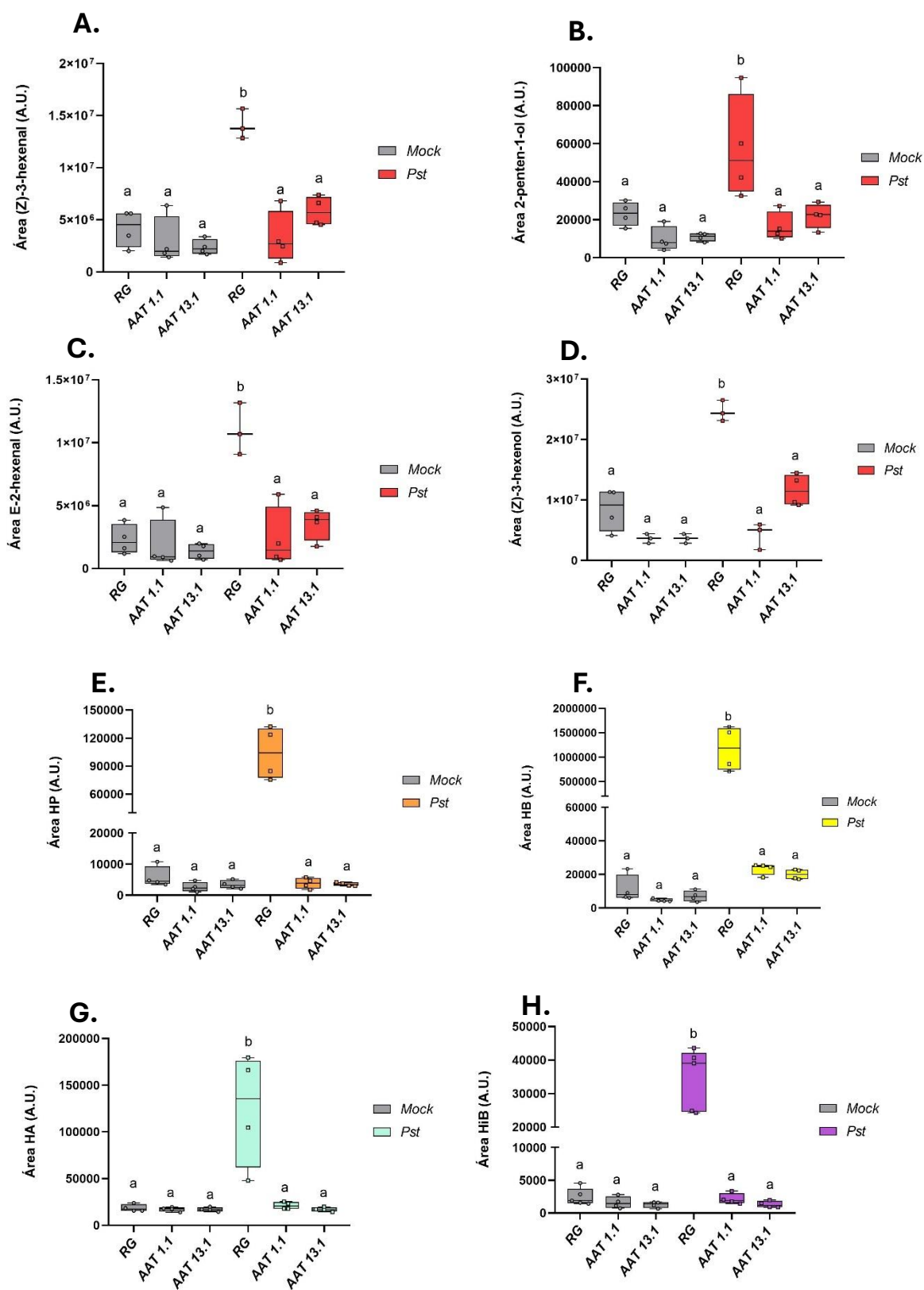
**Tabla S1. Medios de cultivo utilizados en los experimentos.**

Gen	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
<i>Actina</i>	5'-CTA GGC TGG GTT CGC AGG AGA TGA TGC-3'	5'-GTC TTT TTG ACC CAT ACC CAC CAT CAC AC-3'
<i>AAT</i>	5'-TCT CCT AAG TGC TAG ATC ATC ACC AA-3'	5'-CCA CGC AAT TTT TGA TTC AAT TT-3'
<i>PR1</i>	5'-ACT CAA GTA GTC TGG CGC AAC TCA-3'	5'-AGT AAG GAC GTT GTC CGA TCG AGT-3'
<i>TomloxF</i>	5'-CCG AAT CAA AGG GTG ACT TT-3'	5'-GGT CTG TGA TGA TCG AAT GC-3'
<i>HPL</i>	5'-AGCTACGGATTGCCGTTAGT-3'	5'-CCATTCTCTGGTGAAGAA-3'
<i>AOS</i>	5'-CCTCTTCCTTCTTCCACAAA-3'	5'-GCCGGGTATAGTCTGGTAGA-3'
<i>S5H</i>	5'-GGG ATG TCC CGG AAG TAA GT-3'	5'-GGC ATT GGA TGG GAT ATT CA-3'
<i>TomloxD</i>	5'-GGC TTG CTT TAC TCC TGG TC-3'	5'-AAA TCA AAG CGC CAG TTC TT-3'

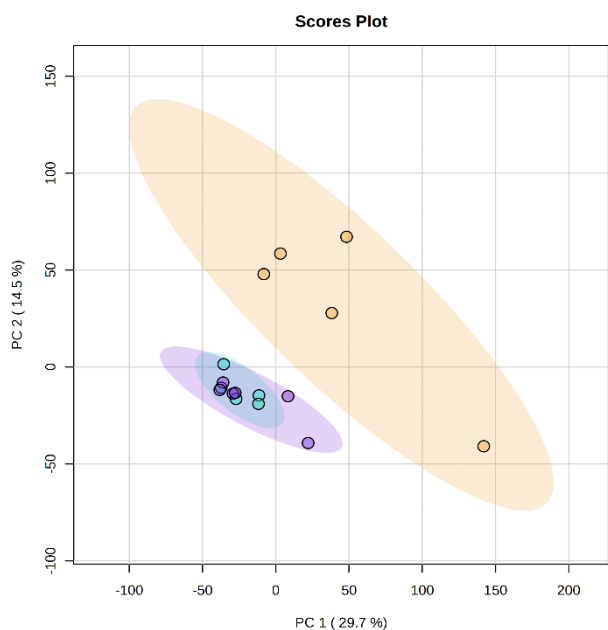
**Tabla S2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de qPCR.**



**Figura S1. Scores plot del PCA** basado en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango  $m/z$  de 35 a 250  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  en la **cuarta hoja de plantas RG** (RG Mock local, azul), **AAT 1.1** (AAT 1.1 Mock local, rojo) y **AAT 13.1** (AAT 13.1 Mock local, verde), **24 horas después de una inoculación local con  $\text{MgCl}_2$ , (Mock).**



**Figura S2.** Emisión de (Z)-3-hexenal (A), 2-penten-1-ol (B), E-2-hexenal (C), (Z)-3-hexenol (D), HP (E), HB (F), HA (G) y HiB (H) en la cuarta hoja de plantas RG, AAT 1.1 y AAT 13.1, 24 horas después de una inoculación local en dicha hoja con MgCl<sub>2</sub> (Mock; gris) o con *Pst* (rojo (A, B, C, D), naranja (E), amarillo (F), azul (G) y morado (H)). Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el *Tukey test* ( $P < 0,05$ ).



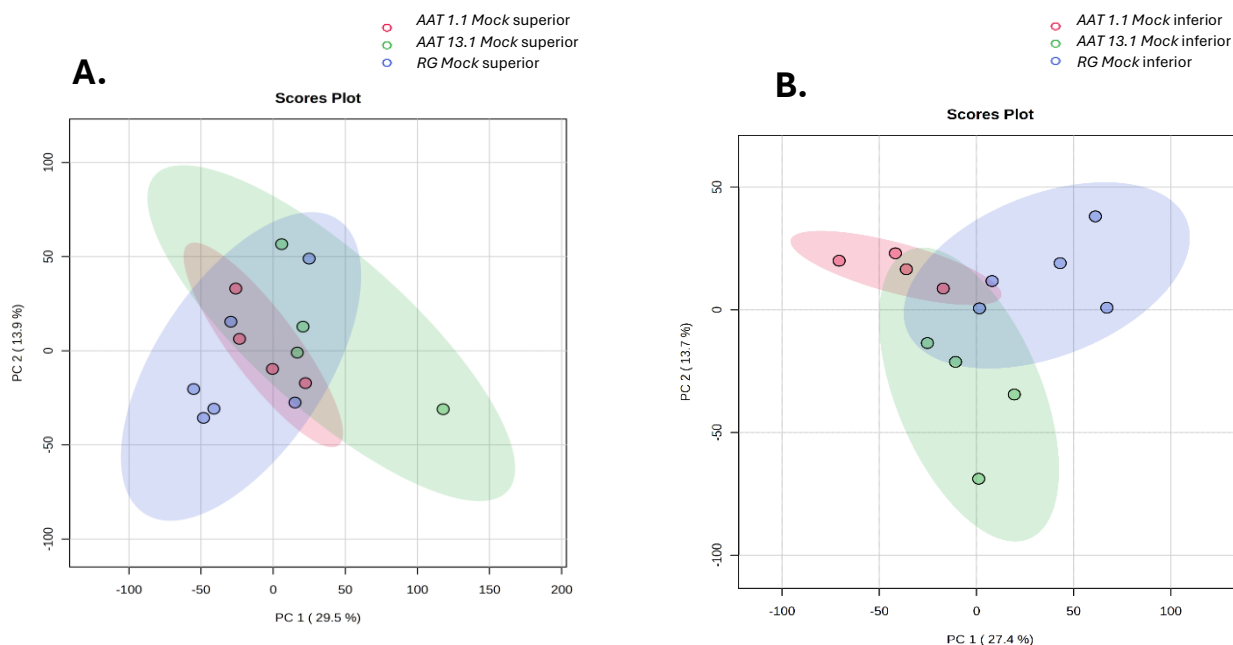
### RG mock local

- **Terpenoides**
  - $\gamma$ -terpineno\*
  - 2-careno\*
  - $\beta$ -cariofileno\*
  - $\alpha$ -terpinyl acetate\*
  - Limoneno\*
  - $\alpha$ -humuleno\*
  - Terpinoleno\*
  - Aromadendreno\*
- **GLVs**
  - (Z)-3-hexenal
  - (Z)-2-penten-1-ol
- **Bencenoides**
  - Acetofenona\*
  - m-tolualdehido
- **Otros**
  - Ácido hexanoico\*
  - Octanal

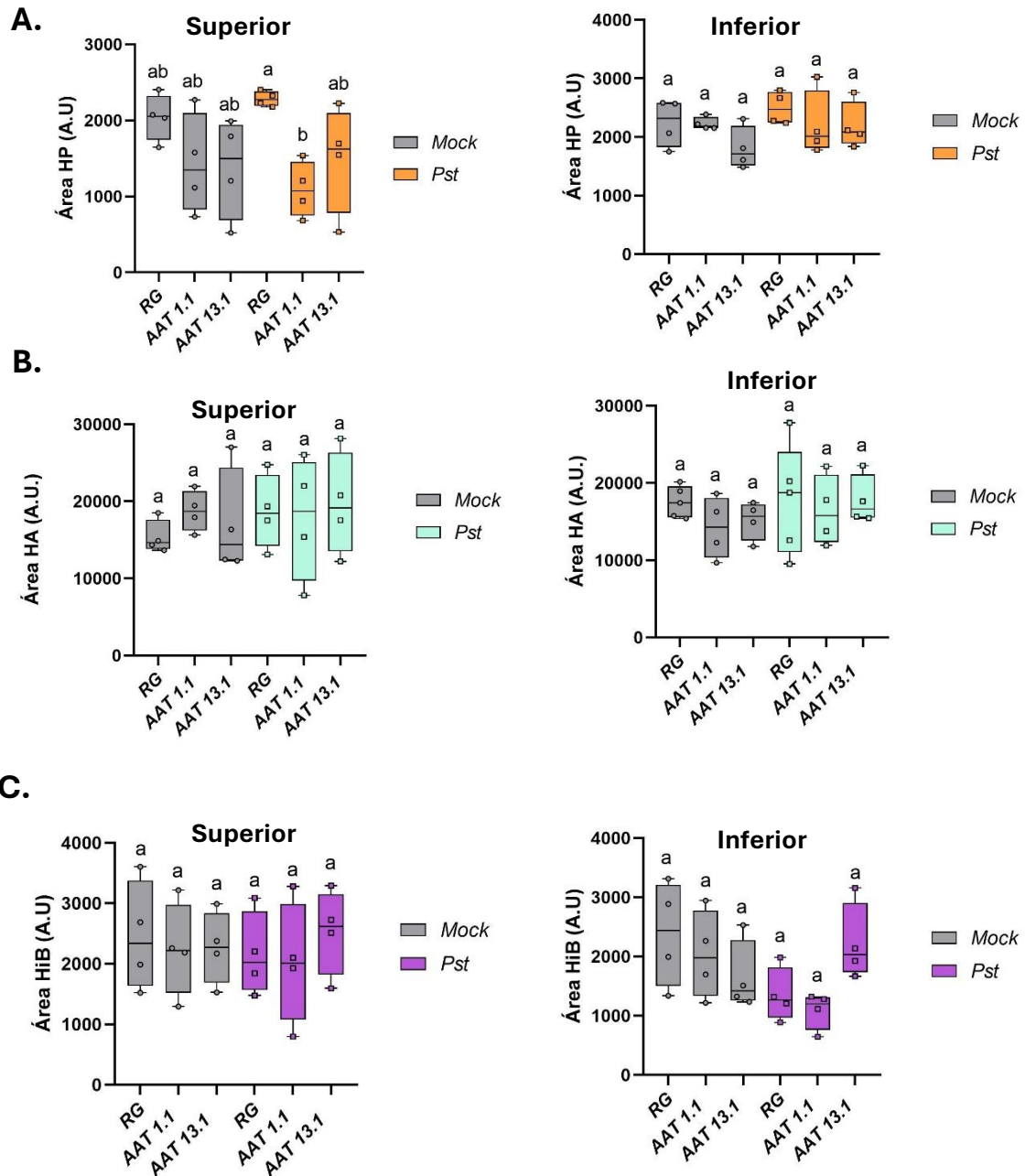
### RG mock superior e inferior

- **Bencenoides**
  - Ácido benzoico\*

**Figura S3. Scores plot del PCA** basado en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango  $m/z$  de 35 a 250  $g \cdot mol^{-1}$  en la **tercera (RG Mock inferior, azul), la cuarta hoja (RG Mock local, amarillo) y la quinta hoja (RG Mock superior, morado) de plantas RG, 24 horas después de una inoculación local en la cuarta hoja con  $MgCl_2$  (Mock)**. Los compuestos marcados con un asterisco también son significativos en la inoculación con *Pst*.



**Figura S4. Scores plot de los PCA** basado en la abundancia de señales detectadas por espectrometría de masas en el rango  $m/z$  de 35 a 250  $g/mol$  en la **quinta hoja (A, superior) y la tercera hoja (B, inferior) de plantas RG (azul), AAT 1.1 (rojo) y AAT 13.1 (verde), 24 horas después de una inoculación local en la cuarta hoja con  $MgCl_2$  (Mock)**.



**Figura S5. Emisión de HP (A), HA (B) y HiB (C) en la quinta (superior) y tercera hoja (inferior) de plantas RG, AAT 1.1 y AAT 13.1, 24 horas después de una inoculación local en la cuarta hoja con MgCl<sub>2</sub> (Mock; gris) o con Pst (naranja, azul, morado).** Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el Tukey test ( $P < 0,05$ ).