

Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

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

**Estudio del papel defensivo y del
mecanismo de acción de los ésteres del (Z)-
3-hexenol en plantas de tomate frente a
*Pseudomonas syringae***

TRABAJO FIN DE GRADO

Titulación: **Biología**

Curso: **2016/2017**

Realizado por:

Celia Payá Montes

Directoras:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Dra. M^a Pilar López Gresa

Valencia, Junio 2017

Resumen

Valencia, Junio 2017

Estudio del papel defensivo y del mecanismo de acción de los ésteres del (Z)-3-hexenol en plantas de tomate frente a *Pseudomonas syringae*.

En respuesta a las señales de estrés, las plantas sintetizan proteínas de defensa y compuestos químicos de diversa naturaleza. Entre otros, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) pertenecen a este grupo de compuestos defensivos (Niinemets *et al.*, 2013).

Algunos ésteres de (Z)-3-hexenilo se encuentran inducidos diferencialmente como consecuencia de la infección de plantas de tomate con la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (López-Gresa *et al.*, en revisión).

Este proyecto trata de confirmar el papel defensivo de estos ésteres mediante el análisis de sus propiedades defensivas directas (antibacterianas y/o antioxidantes). Por otra parte, se han analizado sus propiedades defensivas señalizadoras mediante la realización de tratamientos exógenos con dichos VOCs y el estudio de diferentes aspectos tales como la modificación de la resistencia o susceptibilidad, la acumulación de compuestos señalizadores y defensivos y la inducción de proteínas defensivas, entre otros. Por último se estudiará el posible mecanismo de acción de estos compuestos volátiles de hoja verde ante la bacteria *Pseudomonas syringae*.

Nuestros estudios refuerzan la importancia de los VOCs como compuestos fundamentales en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos. Asimismo, la naturaleza volátil de estos compuestos defensivos permitiría, como posible aplicación biotecnológica, que plantas transgénicas que emitieran estos compuestos de manera constitutiva, pudieran ser consideradas en sí mismas como inductoras de resistencia de sus plantas vecinas, convirtiéndose en plantas transgénicas biofortificantes.

Palabras clave: VOCs, tomate, defensa, *Pseudomonas syringae*, ésteres de (Z)-3-hexenilo

Autora:

Celia Payá Montes

Directoras:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Dra. M^a Pilar López Gresa

Abstract

Valencia, June 2017

Study of the defensive role and mechanism of action of (*Z*)-3-hexenol esters in tomato plants against *Pseudomonas syringae*.

In response to stress signals, plants synthesize defense proteins and chemical compounds of diverse constitution. Among others, volatile organic compounds (VOCs) belong to this defensive compounds group (Niinemets *et al.*, 2013).

Some (*Z*)-3-hexenyl esters are differentially induced as a consequence of tomato plants infection with the avirulent bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Lopez-Gresa *et al.*, under review).

This project has focused on the confirmation of the defensive role of these esters by analyzing their direct defensive properties (antibacterial and/or antioxidants). On the other hand, their defensive signaling properties have been analyzed by means of exogenous treatments with these VOCs and the study of different aspects such as the resistance or susceptibility modification, the accumulation of signaling and defensive compounds and the induction of defensive proteins, among others. Finally, the possible mechanism of action of these green leaf volatile compounds against the bacteria *Pseudomonas syringae* will be studied.

Our studies reinforce the importance of VOCs as fundamental compounds in the defensive response of plants against pathogens. Likewise, the volatile behaviour of these defensive compounds would allow, as a possible biotechnological application, transgenic plants to emit these compounds in a constitutive manner, being considered as resistance inducers of their neighboring plants, becoming biofortifying transgenic plants.

Keywords: VOCs, tomato, defense, *Pseudomonas syringae*, (*Z*)-3-hexenyl esters.

Author:

Celia Payá Montes

Directors:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Dra. M^a Pilar López Gresa

Resum

València, Juny 2017

Estudi del paper defensiu y del mecanisme d'acció dels èsters del (Z)-3-hexenol en plantes de tomaca front a *Pseudomonas syringae*.

En resposta a les senyals d'estrès, les plantes sintetitzen proteïnes de defensa i compostos químics de diversa natura. Entre altres, els compostos orgànics volàtils (VOCs) pertanyen a aquest grup de compostos defensius (Niinemets *et al.*, 2013).

Alguns èsters de (Z)-3-hexenil es troben induïts diferencialment com a conseqüència de la infecció de plantes de tomaca amb la bactèria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (López-Gresa *et al.*, en revisió).

L'objectiu del TFG consistirà en confirmar el paper defensiu d'aquests èsters per mitjà de l'anàlisi de les seues propietats defensives directes (antibacterianes i/o antioxidants). D'altra banda, s'analitzen les seues propietats defensives senyalitzadores mitjançant la realització de tractaments exògens amb els anteriorment esmentats VOCs i l'estudi de diferents aspectes tals com la modificació de la resistència o susceptibilitat, l'acumulació de compostos senyalitzadors i defensius i la inducció de proteïnes defensives entre altres. Finalment, s'estudiarà el possible mecanisme d'acció d'aquests compostos volàtils de fulla verda davant de la bactèria *Pseudomonas syringae*.

Els nostres estudis podran reforçar la importància dels VOCs com compostos fonamentals en la resposta defensiva de les plantes front a patògens. Així mateix, la naturalesa volàtil d'aquests compostos defensius permetria, com a possible aplicació biotecnològica, que plantes transgèniques que emeteren aquests composts constitutivament, pogueren ser considerats en si mateixes com inductores de resistència de les seues plantes veïnes, convertint-se en plantes transgèniques biofortificants.

Paraules clau: VOCs, tomaca, defensa, *Pseudomonas syringae*, èsters de (Z)-3-hexenil

Autora:

Celia Payá Montes

Directores:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Dra. M^a Pilar López Gresa

Agradecimientos

Aunque sea complicado, me gustaría expresar brevemente mi más sincera gratitud a todas y cada una de las personas que me han ayudado en ese breve pero muy intenso proyecto.

En primer lugar, como no podría ser de otra forma, dar gracias a Puri y a Mapi, no solo por todo lo aprendido gracias a ellas, sino por todo el apoyo, comprensión y confianza que han depositado en mi. Habéis conseguido reavivar y potenciar mi lado investigador, y sobre todo, me habéis enseñado a seguir siempre adelante y sacar la parte buena de cada experimento, por muy difícil que fuera a veces. Vosotras si que sois unas cracks.

A Isamel y Jose M^a, por toda vuestra sabiduría y consejos. Ha sido un placer formar parte de vuestro equipo.

Como no, a Edu y Samuel, por aguantarme cada día, con mejor o peor humor. Gracias por poder contar con vosotros siempre que lo necesite y amenizarme esos días que parece que no acaban nunca. Ojalá y "nuestro proyecto" futuro se haga realidad.

A Miguel, del que he aprendido que hay que tener en cuenta hasta el mínimo detalle para que todo salga perfecto. Gracias no solo profesionalmente, sino también por tu amistad.

Por último, y no menos importante, gracias gracias y gracias a mi mis padres y mi hermana, el pilar de apoyo más importante, sólido, y que va a estar ahí siempre. A Jose. Gracias a vosotros me he convertido en la persona que soy.

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

Índice general

Resumen	III
Abstract	V
Resum	VII
Índice general	VIII
Índice de figuras	X
1. Introducción	1
1.1. El sistema defensivo de las plantas	1
1.1.1. Tipos de respuesta defensiva frente a patógenos	1
1.1.2. La respuesta defensiva de las plantas frente a la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	4
1.2. Agentes inductores de resistencia frente a patógenos	5
1.2.1. Inductores de resistencia de naturaleza química	5
1.2.2. Inductores de resistencia biológicos	6
1.3. El papel de los compuestos volátiles en el sistema defensivo de las plantas	7
1.3.1. Biosíntesis de los VOCs	7
1.3.2. VOCs en la interacción planta-patógeno	9
2. Objetivos	11
3. Materiales y Métodos	13
3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	13
3.1.1. Germinación de semillas	13
3.1.2. Condiciones de cultivo	13
3.2. Material microbiológico	13
3.3. Tratamientos con compuestos volátiles	13
3.3.1. Tratamiento con ésteres en cámaras de metacrilato	14
3.4. Infecciones	14
3.4.1. Preparación del inóculo bacteriano	15
3.4.2. Infección bacteriana	16
3.5. Toma de muestra	16
3.6. Estudio del crecimiento bacteriano	16
3.6.1. Conteo bacteriano en hoja de tomate	16
3.7. Medidas de apertura estomática	17
3.8. Análisis cuantitativo de transcritos mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR)	18
3.8.1. Extracción del RNA total	18
3.8.2. Cuantificación de RNA	18
3.8.3. Precipitación de RNA con cloruro de litio (LiCl)	18
3.8.4. Tratamiento con DNasa	18
3.8.5. Retrotranscripción	19
3.8.6. Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)	19
3.9. Ensayos de inhibición bacteriana en placa	20
3.10. Análisis estadístico	20

4. Resultados y Discusión	21
4.1. Estudio del papel defensivo directo de los VOCs	21
4.2. Estudio del comportamiento estomático y de la inducción de rutas de señalización defensivas mediante el tratamiento de plantas de tomate con VOCs	23
4.2.1. Efecto de los compuestos volátiles sobre el cierre estomático	23
4.2.2. Inducción de rutas de señalización defensivas tras la aplicación de compuestos volátiles	25
4.3. Estudio del efecto de los compuestos volátiles en la inducción de resistencia frente a infección bacteriana con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 Δ <i>AvrPto</i>	28
4.3.1. Influencia de tratamientos VOCs sobre el crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i>	29
4.4. Perspectivas futuras	30
5. Conclusiones	33
6. Bibliografía	35

Índice de figuras

1.1. Modelo general del sistema inmune innato de las plantas. Este modelo puede dividirse en 3 etapas diferentes: (I) percepción de DAMPs, MAMPs o PAMPs por parte de receptores de la membrana e intracelulares; (II) transducción de la señal inducida por elicitores; (III) generación de respuestas de defensa específicas, como formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), producción y deposición de callosa y síntesis de metabolitos secundarios (Adaptación de Corwin and Kliebenstein, 2017)	2
1.2. Modelo en zig-zag ilustrativo del sistema defensivo de las plantas. En la fase I, la planta reconoce los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de los PRRs, desencadenando la inmunidad activada por estas moléculas (<i>PAMPs-Triggered Inminuty</i> , PTI). En la fase II, algunos patógenos producen efectores que pueden interferir con la PTI ocasionando la susceptibilidad desencadenada por el efector (<i>Effector-Triggered Susceptibility</i> , ETS). En la fase III, el factor de avirulencia <i>Avr</i> es reconocido por una proteína <i>R</i> y se activa la inmunidad ligada al efector (<i>Effector-Triggered Immunity</i> , ETI) que suele desencadenar una respuesta hipersensible (HR), produciéndose la muerte celular en el lugar de la infección (Adaptación de Jones and Dangl, 2006).	3
1.3. Fase biótrofa del ciclo infectivo de <i>Pseudomonas syringae</i>. Imagen tomada con microscopía confocal de células de <i>Pst</i> DC3000 marcadas con GFP. La imagen muestra como las bacterias se localizan alrededor del estoma abierto (flecha amarilla) pero no se posicionan alrededor del estoma cuando este está cerrado (flecha blanca)(Melotto <i>et al.</i> ,2006).	4
1.4. Visión general de las rutas biosintéticas de VOCs. Las cuatro principales rutas de biosíntesis de VOCs son: la ruta del shikimato, la ruta del ácido mevalónico (MVA), la ruta del metileritritol fosfato (MEP) y la de las lipoxigenasas (LOX). (Adaptación de Duradeva <i>et al.</i> 2013).	8
1.5. Ruta de las oxilipinas. Una vez los precursores de la síntesis de VOCs (ácido linoleico y linoleico) entran en la ruta de las lipoxigenasas (LOX), actúan n una serie de enzimas (señaladas en el diagrama) para dar lugar a la formación de jasmonatos y GLVs (ul Hassan <i>et al.</i> , 2015).	9
3.1. Estructura química de los compuestos volátiles empleados en los tratamientos de las plantas de tomate en cámaras de metacrilato.	14
3.2. Representación de la medida del ancho (D) y el alto (d) de un estoma tipo.	17
4.1. Inhibición de crecimiento bacteriano en placas de King B agar. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de los compuestos acetato de (<i>Z</i>)-3-hexenilo (HA), tetraciclina (T) y metanol (M). (A) Concentración de HA 100 % (v/v) y 0.785 (p/v) en el caso de T. (B) Concentración de HA 50 % (v/v) y 0.395 (p/v) de T.	21

- 4.2. **Ratio de apertura estomática de plantas de tomate Flora-Dade tratadas con propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y metil jasmonato (MJ).** (A) Índice de apertura estomática en hojas de tomate 24 horas después del tratamiento en cámaras de metacrilato con HP, HIB, MJ y agua en el caso del control. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los ratios corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 50 estomas correspondientes a 3 plantas independientes de un experimento representativo. El triple asterisco (***) indica que existe una significación estadística con un *p-value* <0.001 entre las plantas control y las plantas tratadas. (B) Imagen correspondiente a estomas representativos de una planta control y una planta tratada con HP, respectivamente. 24
- 4.3. **Expresión del gen MYB60 en plantas de tomate Flora-Dade tratadas con propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y metil jasmonato (MJ).** Nivel de expresión de *MYB60* en plantas de tomate FD 24 horas después de realizarse tratamientos con HP, HIB, MJ y agua en el caso del control. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor de elongación 1 alfa (eEF1 α). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de tres plantas de un experimento representativo. No hay significación estadística entre las plantas tratadas y las control. 25
- 4.4. **Expresión de los genes *JAZ3*, *JAZ7*, *TCI21* de plantas de tomate Flora-Dade tratadas con propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y metil jasmonato.** (A) Niveles de expresión de los genes *JAZ3*, (B) *JAZ7* y (C) *TCI21* en plantas de tomate FD a tiempo 0 y 24 horas después de realizarse tratamientos con HP, HIB, MJ y agua en el caso del control. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor de elongación 1 alfa (eEF1 α). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) indica que existe una significación estadística con un *p-value* <0.05 entre las plantas control y las plantas tratadas. 26
- 4.5. **Expresión de los genes *PR1* y *P23* de plantas de tomate Flora-Dade tratadas con propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y metil jasmonato (MJ).** (A) Niveles de expresión de *PR1* y (B) *P23* en plantas de tomate FD a tiempo 0 y 24 horas después de realizarse tratamientos con HP, HIB, MJ y agua en el caso del control. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor de elongación 1 alfa (eEF1 α). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) indica que existe una significación estadística con un *p-value* <0.05 entre las plantas control y las plantas tratadas. 28

4.6. **Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Δ *AvrPto* en hojas de plantas de tomate Flora-Dade control y de plantas Flora-Dade pre-tratadas con propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y metil jasmonato (MJ) 24h post-infección.** Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) indica que existe una diferencia significativa de las plantas pre-tratadas con HP respecto a las plantas control, con un *p-value* <0.05 29

Lista de abreviaturas

ABA : Ácido Abscísico

Avr : Factor de avirulencia

c.f.u. : Unidades formadoras de colonias

COR : Coronatina

DAMPs : *Damage-Associated Molecular Patterns*

eEF1 α : Factor de Elongación 1 alfa

ET : Etileno

ETI : *Effector-Triggered Immunity*

FD : Flora-Dade

FLS2 : *Flagellin-sensitive 2*

GLVs : *Green Leaf Volatiles*

HA : Acetato de (*Z*)-3-hexenilo

HB : Butanoato de (*Z*)-3-hexenilo

HIB : Isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo

HP : Propanoato de (*Z*)-3-hexenilo

HR : *Hypersensitive Reaction*

JA : Ácido Jasmónico

LOX : Lipoxigenasas

M : Metanol

MAMPs : *Microbe-Associated Molecular Patterns*

MJ : Metil Jasmonato

PAMPs : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PRRs : *Pattern Recognition Receptors*

ÍNDICE DE FIGURAS

PRs : *Pathogenesis-Related Proteins*

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

PTI : *PAMP Triggered Immunity*

pv. : Patovar

qRT-PCR : Transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa

R : Gen de resistencia

SA : Ácido Salicílico

SAR : *Systemic Acquired Resistance*

T : Tetraciclina

VOCs : *Volatile Organic Compounds*

1.1. El sistema defensivo de las plantas

En la naturaleza, las plantas están expuestas a multitud de factores tanto bióticos como abióticos. A este entorno, que en ciertas ocasiones puede ser hostil, se le suma la característica de que son organismos sésiles, por lo que se ven obligadas a responder a los distintos desafíos que les plantea su entorno y defenderse para asegurar su supervivencia.

En el caso concreto de estrés biótico, las plantas se enfrentan a todo tipo de organismos, desde herbívoros (insectos, mamíferos) hasta microorganismos (bacterias, hongos, virus o viroides). En la mayoría de las ocasiones las plantas consiguen minimizar los daños causados por estos organismos gracias a las armas defensivas que poseen.

1.1.1. Tipos de respuesta defensiva frente a patógenos

Para protegerse a sí mismas, las plantas han desarrollado una gran variedad de defensas tanto de tipo constitutivo como inducible. Las defensas de tipo constitutivo o resistencia pasiva suponen una primera barrera frente al ataque de los patógenos. Se trata de una serie de barreras físicas y químicas presentes de forma natural en las especies vegetales, tales como la pared celular, la superficie foliar, los tricomas o la síntesis de toda una serie de compuestos químicos que pueden resultar directamente tóxicos para el patógeno (compuestos fenólicos, terpenoides, alcaloides, etc.). Estas moléculas se conocen como *metabolitos secundarios* y una de sus funciones principales es la defensiva.

Por otra parte, la repuesta de tipo inducible, o resistencia activa, es posible gracias a los mecanismos que poseen las plantas para reconocer a los inductores patogénicos o *elicitores* y activar toda una serie de respuestas que comprenden cambios transcripcionales, bioquímicos y metabólicos, como pueden ser la producción de compuestos antimicrobianos y antioxidantes, la síntesis de proteínas de defensa o la muerte celular programada (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Según el tipo de reconocimiento, tiene lugar la activación de dos vías de señalización: la vía conocida como PTI (*PAMP Triggered Immunity*) que se activa por el reconocimiento inespecífico de los llamados PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*); y la vía que se activa por la percepción de los efectores, conocida como ETI (*Effector-Triggered Immunity*).

La respuesta defensiva activada por PAMPs (PTI)

El primer nivel de respuesta defensiva de las plantas se basa en la percepción del patógeno por el reconocimiento de patrones moleculares conservados asociados a un grupo de patógenos (PAMPs). Estas moléculas son reconocidas por unos receptores de membrana específicos denominados PRRs (*Pattern Recognition Receptors*).

Uno de los sistemas más estudiados de este tipo respuesta es el receptor transmembrana FLS2 (*flagellin-sensitive 2*), que reconoce la flagelina bacteriana tras la unión directa

del epítipo inmunogénico flg22.

Una vez los elicitores son reconocidos por los PRRs, se desencadena la denominada PTI, donde se coordinan todo un conjunto de respuestas dirigidas a suprimir la actividad bacteriana. Entre los mecanismos de defensa que se activan cabe destacar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la acumulación de callosa en la pared celular (Hückelhoven, 2007), o la síntesis de proteínas de defensa PRs (*Pathogenesis-Related Proteins*).

Además, este tipo de respuesta es inducida por otros factores que pueden derivar de organismos no patogénicos, conocidos como MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*) (Ausubel, 2005); o por el reconocimiento de DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) que son productos de degradación de la planta resultantes de la acción de patógenos (Boller and Felix, 2009; Yamaguchi and Huffaker, 2011)(Figura 1.1).

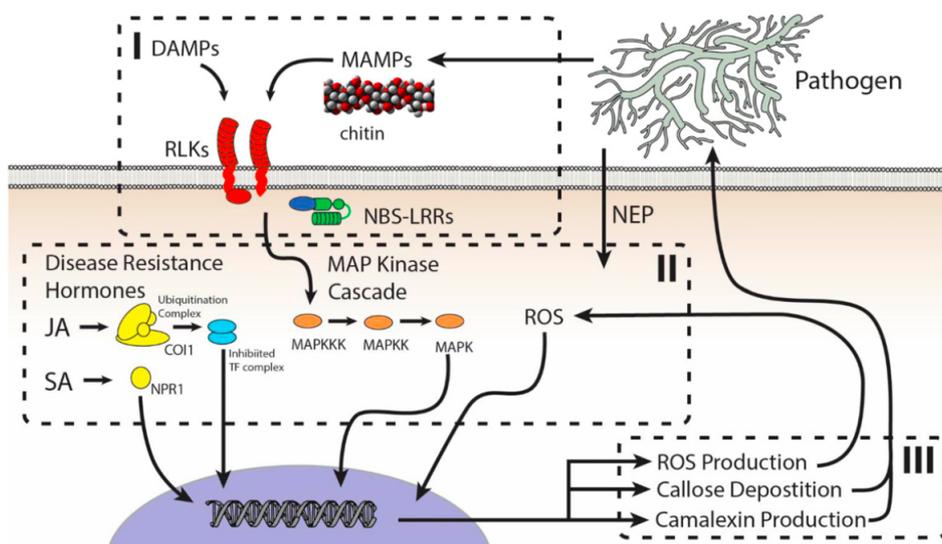


Figura 1.1: Modelo general del sistema inmune innato de las plantas. Este modelo puede dividirse en 3 etapas diferentes: (I) percepción de DAMPs, MAMPs o PAMPs por parte de receptores de la membrana e intracelulares; (II) transducción de la señal inducida por elicitores; (III) generación de respuestas de defensa específicas, como formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), producción y deposición de callosa y síntesis de metabolitos secundarios (Adaptación de Corwin and Kliebenstein, 2017)

La respuesta defensiva activada por efectores (ETI)

Algunos patógenos son capaces de producir efectores o factores de virulencia (*Avr*) que les permiten superar la primera barrera defensiva conocida como PTI. Por su parte, las plantas han contrarrestado este ataque a través de la síntesis de los productos de los genes de resistencia *R*. Dicha interacción permite establecer un segundo nivel defensivo, conocido como ETI (Figura 1.2)(Jones and Dangl, 2006).

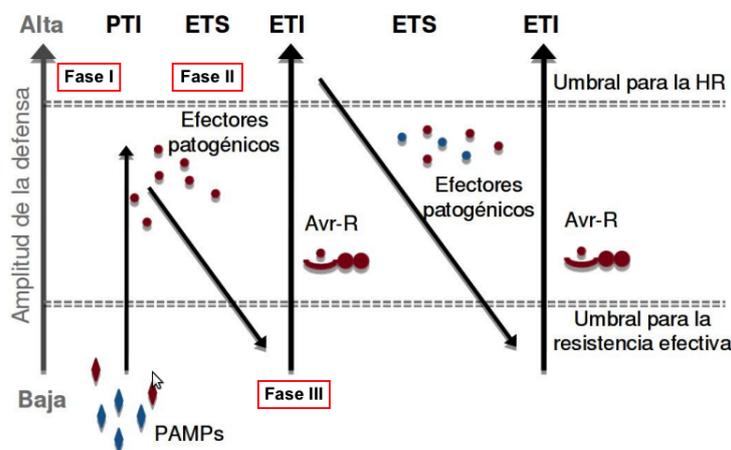


Figura 1.2: Modelo en zig-zag ilustrativo del sistema defensivo de las plantas. En la fase I, la planta reconoce los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de los PRRs, desencadenando la inmunidad activada por estas moléculas (*PAMPs-Triggered Inimmunity*, PTI). En la fase II, algunos patógenos producen efectores que pueden interferir con la PTI ocasionando la susceptibilidad desencadenada por el efector (*Effector-Triggered Susceptibility*, ETS). En la fase III, el factor de avirulencia *Avr* es reconocido por una proteína *R* y se activa la inmunidad ligada al efector (*Effector-Triggered Immunity*, ETI) que suele desencadenar una respuesta hipersensible (HR), produciéndose la muerte celular en el lugar de la infección (Adaptación de Jones and Dangl, 2006).

El modelo de interacción entre un factor codificado por el gen *R* y el factor de avirulencia del patógeno codificado por el gen *Avr* se denomina interacción *gen-a-gen* (Flor, 1971). Este modelo describe dos tipos de interacciones planta-patógeno, la interacción *compatible* e *incompatible*, que determinarán el desarrollo o no de la enfermedad, respectivamente.

Si se produce el reconocimiento entre ambos factores tendrá lugar una interacción *incompatible*, que conllevará la activación de la ETI, desencadenando toda una serie de cascadas de señalización que culminarán con la muerte celular alrededor del punto de entrada del patógeno, impidiendo así la expansión de este. Esta respuesta se conoce como reacción hipersensible (*Hypersensitive Reaction*, HR) que en la mayoría de los casos irá acompañada de la activación posterior de una resistencia sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR). Este tipo de resistencia SAR mantiene la actividad defensiva de la planta frente a un amplio espectro de patógenos de cara a posteriores infecciones, confiriéndole así una especie de “memoria defensiva” (Conrath, 2006; Kachroo and Robien, 2013).

Cualquier otra interacción diferente a la que se da entre el efector *Avr* y el factor codificado por el gen *R* supondrá una interacción *compatible* y por tanto el desarrollo de la enfermedad, en la que el patógeno se extenderá por toda la planta provocando una infección sistémica y no necrotizante.

Uno de los sistemas de reconocimiento *gen-a-gen* mejor estudiado es el que tiene lugar entre la variedad de tomate Rio Grande, portadora o no del gen de resistencia *Pto* que es capaz de reconocer a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que posee el gen de

avirulencia *AvrPto* (Ronald *et al.*, 1992). Esta reacción sería de tipo incompatible, por lo que se desencadenaría la ETI.

1.1.2. La respuesta defensiva de las plantas frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

La bacteria gram-negativa *Pseudomonas syringae* es una de las principales causantes de enfermedades que ocasionan grandes pérdidas económicas en un amplio rango de especies vegetales. Es una de las bacterias fitopatogénicas más estudiadas, por lo que diversas cepas de esta bacteria se han usado como modelo en el estudio de las interacciones planta-patógeno.

Esta bacteria actúa como un patógeno hemibiótrofo, que coloniza principalmente las partes aéreas de la planta, tales como las hojas y los frutos. Su ciclo infectivo se divide en dos etapas: una primera fase biótrofa que se produce cuando el patógeno alcanza la superficie de la planta sana; y una fase necrótrofa en la cual la bacteria penetra en el interior de la planta a través de heridas o aperturas naturales, como los estomas, en el espacio apoplástico (Figura 1.3) (Beattie and Lindow, 1995; Hirano and Upper, 2000; Melotto *et al.* 2008).

Esta especie bacteriana presenta varias cepas, y cada una de ellas es capaz de infectar únicamente a un número limitado de especies vegetales, o incluso a ciertos cultivares de una misma especie. Este grado de especificidad es la base de la clasificación de las cepas de *P. syringae* en patovares (pv.) (Gardan *et al.*, 1999). El patovar DC3000 de *Ps* fue descrito como un patovar de tomate, no obstante, se ha demostrado que también es capaz de infectar a la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (Whalem *et al.* 1991), lo que ha permitido comprender aún mejor los mecanismos moleculares de acción de esta cepa en plantas (Xin and He, 2013).

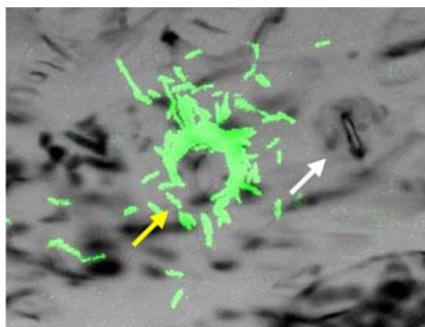


Figura 1.3: Fase biótrofa del ciclo infectivo de *Pseudomonas syringae*. Imagen tomada con microscopía confocal de células de *Pst* DC3000 marcadas con GFP. La imagen muestra como las bacterias se localizan alrededor del estoma abierto (flecha amarilla) pero no se posicionan alrededor del estoma cuando este está cerrado (flecha blanca) (Melotto *et al.*, 2006).

1.2. Agentes inductores de resistencia frente a patógenos

El conocimiento de las bases moleculares de la interacción planta-patógeno así como de las rutas de señalización de defensa de las plantas ha permitido el descubrimiento de compuestos naturales y sintéticos capaces de inducir una respuesta defensiva similar a aquella inducida por el ataque de patógenos. Este tipo de compuestos se conocen como elicitores.

El término elicitador se aplicaba a moléculas capaces de inducir o producir fitoalexinas, no obstante, actualmente se aplica para cualquier tipo de compuesto que sea capaz de estimular cualquier tipo de defensa de la planta, que resultará en un incremento de resistencia por parte de la planta. Dicha estrategia supone una herramienta muy eficaz para aumentar la resistencia de las especies vegetales cultivadas frente a varios patógenos, disminuyendo así las grandes pérdidas de cultivos ocasionados por enfermedades

Los elicitores se clasifican en torno a su naturaleza, distinguiéndose dos grupos: los de naturaleza biológica y los de naturaleza química.

1.2.1. Inductores de resistencia de naturaleza química

Los elicitores químicos o sintéticos son moléculas capaces de desencadenar respuestas defensivas mimetizando la forma de actuar de los elicitores naturales o de las moléculas de señalización de defensiva.

Se ha demostrado que la aplicación de manera exógena de ácido salicílico (SA) y sus derivados como el ácido acetilsalicílico, conocido como aspirina, inducen resistencia frente a una gran variedad de patógenos debido a la acumulación de proteínas PR. De esta forma, se han descubierto varios compuestos químicos análogos al SA que tendrían la misma función defensiva. Entre estos compuestos se encontraría el ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (INA) y el benzotiadiazol (BTH). Ambas sustancias actúan de manera similar al SA con la ventaja de ser menos fitotóxicos y, por lo tanto, más eficientes para su uso en cosecha (Bektas and Eulgem, 2015).

Otro de los inductores químicos más estudiados en plantas es el ácido β -aminobutírico (BABA), un aminoácido no proteico que actúa en diversos mecanismos de defensa en plantas, como la formación de depósitos de callosa, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o el incremento de los niveles de SA y la correspondiente inducción de proteínas PR (Siegrist *et al.*, 2000).

Los compuestos previamente descritos se han estado utilizando en agricultura durante las últimas décadas, actuando frente a un amplio rango de especies de patógenos. Además, estos inductores parecen carecer de un riesgo importante de toxicidad y contaminación en las dosis habitualmente empleadas.

1.2.2. Inductores de resistencia biológicos

Los seres vivos son importantes productores de una extensa lista de compuestos de origen biológico que pueden actuar como inductores de la respuesta defensiva de las plantas frente a una gran variedad de patógenos. Dentro de esta amplia clasificación se encontrarían compuestos derivados de algas, hongos, oomicetos, plantas y bacterias (Wiesel *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta el objetivo de este proyecto, cabe destacar la importancia de los elicitores derivados tanto de plantas como de bacterias.

Elicitores derivados de bacterias

Se ha demostrado que al aplicar exógenamente elicitores procedentes de bacterias se reduce la magnitud de la infección ocasionada por parte de los patógenos. Aquí se encontrarían un amplio rango de compuestos como polisacáridos extracelulares (EPS) o lipopolisacáridos (LPS), derivados de diferentes especies bacterianas.

Sin duda alguna, los elicitores bacterianos más estudiados son la flagelina y el factor de elongación Tu (*EF-Tu*). Los epítomos flg22 y EF-Tu están reconocidos por dos receptores distintos, FLS2 (*Flagellin-sensitive 2*) y EFR (*EF-Tu Receptor*) respectivamente. Además, ambos elicitores actúan en la respuesta defensiva mediada por ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), que son moléculas de señalización claves en el sistema defensivo de las plantas (Zipfel *et al.*, 2004; Chinchilla *et al.*, 2007).

Elicitores derivados de plantas

Las plantas por sí mismas son productoras de un amplio conjunto de moléculas que actúan como elicitores. Dentro de este grupo se encontrarían todo tipo de compuestos derivados de la rotura de la pared celular por la acción de enzimas de bacterias, hongos o herbívoros, entre los que cabría destacar productos como los β -glucanos, xilosa u oligogalacturónidos (OGs) (Fu *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el reconocimiento de estos compuestos por receptores de la membrana desencadenan la activación de una respuesta idéntica a la ETI.

Por otra parte, podría encontrarse otro grupo de moléculas señal que se acumularan diferencialmente en la planta como consecuencia de infecciones patogénicas y que pudieran ser consideradas inductores de resistencia, ya que produjeran la activación de la respuesta defensiva de la planta tras su aplicación exógena (Gao *et al.*, 2014). Tal es el caso de compuestos clave en la señalización defensiva de la planta como son el JA, así como el SA, ya mencionado. Estas moléculas señal tienen un papel clave en la inducción de la respuesta conocida como SAR (Park *et al.*, 2007; Truman *et al.* 2007), por lo que activarían todos los mecanismos de defensa correspondientes de la planta, aumentando así sus niveles de resistencia frente a una posterior infección.

Por último, hay que tener en cuenta la importancia de los derivados metilados de estos compuestos, el metiljasmonato (MJ) y el metilsalicilato (MeSA), respectivamente, que también inducen este tipo de respuestas. La metilación de estos ácidos les confiere una apolaridad que les permite volatilizarse y formar parte de la variada familia de compuestos

orgánicos volátiles, que también tienen un papel fundamental en el sistema defensivo de la planta.

1.3. El papel de los compuestos volátiles en el sistema defensivo de las plantas

Las plantas son capaces de sintetizar una enorme variedad de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que poseen una función fundamentalmente ecológica, facilitando las interacciones con su entorno, desde la atracción de polinizadores hasta la protección frente a todo tipo de patógenos, parásitos y herbívoros. Otra característica importante de estos compuestos es su naturaleza físico-química, ya que su bajo peso molecular les permite atravesar libremente membranas celulares y así poder liberarse al ambiente que les rodea (Pichersky *et al.*, 2006).

1.3.1. Biosíntesis de los VOCs

La biosíntesis de estos compuestos volátiles depende de la disponibilidad de moléculas que derivan del metabolismo primario, como carbono, nitrógeno y azufre, lo que confirmaría el alto grado de interconexión entre el metabolismo primario y secundario de las plantas.

Según su origen biosintético, los VOCs se dividen en varios grupos, en los que se incluirían terpenos, fenilpropanoides/bencenoides, volátiles de hoja verde (*Green Leaf Volatiles*; GLVs), metil jasmonato y toda una serie de compuestos específicos de distintas especies que no quedarían recogidos dentro de las clases principales (Figura 1.4)(Duradeva *et. al*, 2013).

Dentro de esta amplia clasificación, vamos a prestar atención a los GLVs ya que todos los compuestos volátiles empleados en los experimentos que forman parte de este proyecto pertenecen a este grupo.

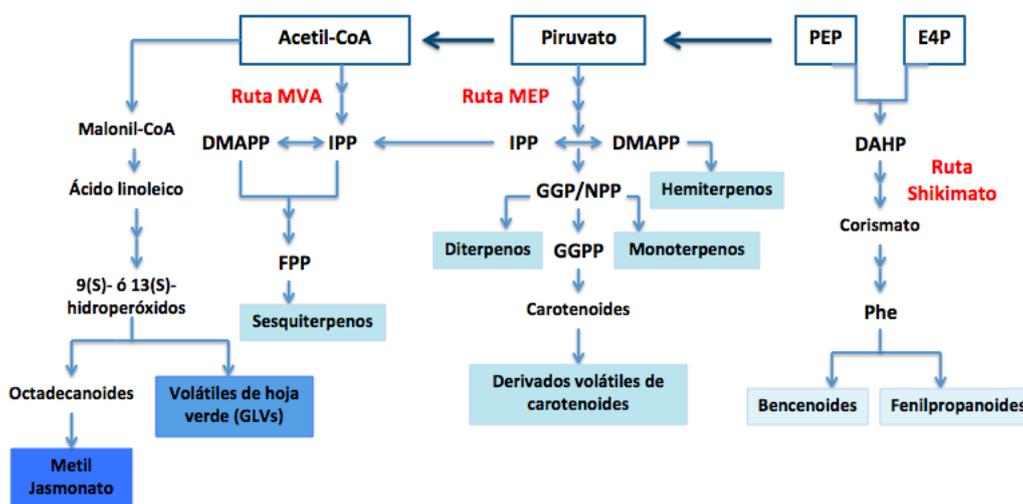


Figura 1.4: Visión general de las rutas biosintéticas de VOCs. Las cuatro principales rutas de biosíntesis de VOCs son: la ruta del shikimato, la ruta del ácido mevalónico (MVA), la ruta del metileritritol fosfato (MEP) y la de las lipoxigenasas (LOX). (Adaptación de Duradeva *et al.* 2013).

Green Leaf Volatiles (GLVs)

Los GLVs son aldehídos y/o alcoholes de 6 átomos de carbono y sus respectivos ésteres que se sintetizan normalmente en tejidos verdes de la planta como respuesta a cualquier tipo de daño, además de ser los causantes del aroma "fresco" característico de muchas especies vegetales (Duradeva *et al.*, 2013).

Estos compuestos se sintetizan a partir de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, linoleico y linolénico, mediante la ruta de las oxilipinas o lipoxigenasas (LOX). Esta ruta es una de las vías más importantes y mejor estudiadas en lo que respecta a la activación de genes de defensa. Estos ácidos grasos entran en la ruta de las oxilipinas por la acción de las lipasas, sobre ellos actúan las LOX para dar lugar a hidroperóxidos convirtiéndose en sustrato de la aleno óxido sintasa (AOS), dando lugar a la síntesis de jasmonatos, o de la hidroperóxido liasa (HPL) para dar lugar a la amplia familia de GLVs, entre los que se encontrarían compuestos como el (*E*)-2-hexenal, el (*Z*)-3-hexenal o el (*Z*)-3-nonenal (Figura 1.5) (ul Hassan *et al.*, 2015).

Por último, los aldehídos de 6 carbonos derivados de esta ruta pueden transformarse en sus correspondientes alcoholes y ésteres gracias a la actividad de la alcohol deshidrogenasa (ADH) o la aciltransferasa (AAT), respectivamente (Matsui *et al.*, 2006; D'Auria *et al.*, 2007). Esto es lo que ocurriría con los ésteres derivados del (*Z*)-3-hexenol utilizados en este trabajo, los cuales se sintetizarían a partir la transformación del (*Z*)-3-hexenal en (*Z*)-3-hexenol y finalmente en ésteres, tales como el propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP) o el isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB).

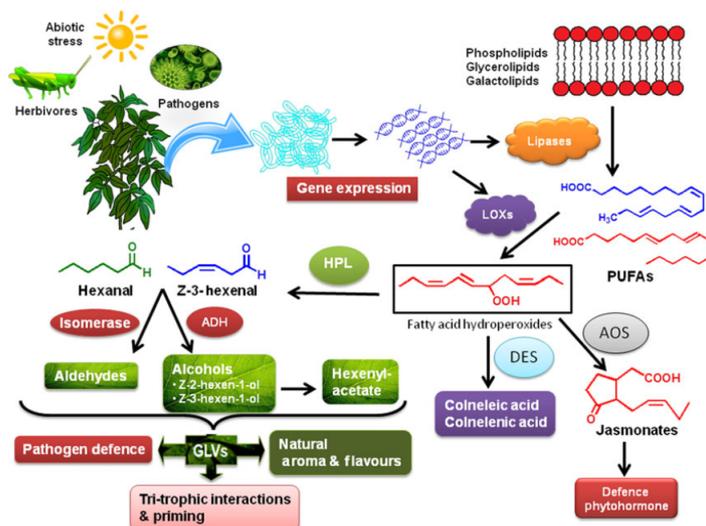


Figura 1.5: Ruta de las oxilipinas. Una vez los precursores de la síntesis de VOCs (ácido linoleico y linoleico) entran en la ruta de las lipoxigenasas (LOX), actúan n una serie de enzimas (señaladas en el diagrama) para dar lugar a la formación de jasmonatos y GLVs (ul Hassan *et al.*, 2015).

1.3.2. VOCs en la interacción planta-patógeno

Como se ha citado anteriormente, las plantas emiten mezclas de VOCs en respuesta a daños causados tanto por microorganismos como por herbívoros. Estas emisiones suelen ser bastante complejas, ya que de ellas forman parte más de 200 de compuestos diferentes, además de ser específicas del tipo de atacante (Duradeva *et al.*, 2006).

La emisión de estos compuestos volátiles puede darse de manera constitutiva o inducida, siendo ésta última la ocasionada como consecuencia de estreses bióticos y abióticos. A su vez, la respuesta inducida puede ser directa, si los volátiles emitidos participan directamente en los mecanismos de defensa o en la tolerancia a estrés; o indirecta, si los VOCs actuaran como elicitores, alertando a las plantas vecinas del ataque que han sufrido por cualquier organismo (Niinemets *et al.*, 2013).

La mayor parte de los trabajos en los que se describen VOCs asociados a la respuesta defensiva de la plantas se centran en el estudio de la interacción planta-herbívoro. Aunque también varios estudios han demostrado que las plantas emiten VOCs tras haber sido infectadas por patógenos (hongos, bacteria, virus) (Spinelli *et al.*, 2010; Toome *et al.*, 2010). Sin embargo, son pocos los estudios realizados hasta el momento describiendo la emisión de VOCs inducidos por bacterias. Aún así, se ha descrito la liberación de VOCs en plantas de la especie *Capsicum annuum* infectadas con la bacteria *Xanthomonas* (Carloza and Tumlinson, 2006) o en plantas de maíz infectadas con *Pantoea ananatis* (Delaney *et al.*, 2015). Recientemente, se ha descrito que la emisión de diferentes monoterpenos y sesquiterpenos podría estar asociada a la tolerancia al huanglongbing en cítricos (Hijaz *et al.*, 2016). Respecto a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, se ha descrito la inducción de distintos VOCs en plantas de tabaco y de pimiento infectadas por distintas

cepas de esta bacteria (Huang *et al.*, 2003; 2005).

Cabe destacar que en nuestro laboratorio se realizó el análisis metabolómico diferencial dirigido a VOCs de la respuesta defensiva de plantas de tomate variedad Rio Grande *Pto* infectadas tanto con la cepa portadora (avirulenta) como con la no portadora (virulenta) del gen *AvrPto* de la bacteria *Pst*. La comparación de los perfiles metabolómicos entre ambos tipos de infección reveló una serie de compuestos volátiles que se acumulaban de forma diferencial en cada interacción. Se concluyó que la planta emite de manera diferencial ésteres derivados del (*Z*)-3-hexenol y (*E*)-4-hexenilo, tales como acetato, propanoato y butanoato de (*Z*)-3-hexenilo y algunos monoterpenos hidroxilados, como el α -terpineol, 4-terpineol y el linalool, cuando la infección es avirulenta y por lo tanto, tiene lugar la activación de la ETI (López-Gresa *et al.*, en revisión).

También se comprobó que ciertos VOCs inducidos como consecuencia de la infección bacteriana con *Pst*, tales como el linalool, α -terpineol, acetato de (*Z*)-3-hexenilo o butanoato de (*Z*)-3-hexenilo podrían actuar como metabolitos defensivos ya que su aplicación exógena inducía la expresión de genes implicados en la respuesta defensiva frente a patógenos y les confería una cierta resistencia frente a la infección bacteriana (Kabbas, 2015; Ozáez, 2017).

Todos estos resultados remarcan la importancia de los VOCs en el sistema defensivo de las plantas. Estos compuestos podrían presentar algún tipo de propiedades biológicas por sí mismos, como antibióticos, antifúngicos y/o antioxidantes, o bien podrían señalar rutas defensivas de la planta y utilizarse como inductores de resistencia. Por otra parte, el desarrollo de plantas transgénicas que nos permitieran manipular la emisión de compuestos volátiles, ya sea incrementando o disminuyéndolos, nos permitiría profundizar tanto a nivel genético como metabólico, en el estudio de su mecanismo de acción. Además, estas plantas con niveles alterados de estos compuestos podrían mostrar una mayor resistencia frente a un amplio rango de agentes infecciosos y constituir una nueva herramienta biotecnológica en la lucha frente a patógenos.

2

Objetivos

En nuestro laboratorio se realizó un análisis metabolómico para identificar compuestos orgánicos volátiles sintetizados de manera diferencial en plantas de tomate infectadas con una cepa avirulenta de la bacteria *Pseudomonas syringae* DC3000 pv. *tomato*. En este estudio, se identificaron diferentes ésteres del (*Z*)-3-hexenol tales como el acetato, el propanoato, el butanoato y el isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo como VOCs característicos durante el establecimiento de ETI.

En el presente Trabajo Fin de Grado se pretende estudiar el posible papel defensivo de estos GLVs. Para ello, se han abordado los siguientes objetivos:

- I . Estudio del papel defensivo directo de distintos GLVs mediante un ensayo de actividad antibiótica *in vitro* frente a la bacteria virulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Δ *AvrPto*.
- II . Estudio del comportamiento estomático y de la inducción de la respuesta defensiva de plantas de tomate tras los tratamientos exógenos con los compuestos propanoato de (*Z*)-3-hexenilo, isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo y metil jasmonato en cajas cerradas.
- III . Estudio de la inducción de resistencia frente a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Δ *AvrPto* ocasionada por el tratamiento de plantas de tomate con los GLVs propanoato, isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo y metil jasmonato.

3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Para la realización del presente trabajo se emplearon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad Flora-Dade (FD) cultivadas en los invernaderos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP).

3.1.1. Germinación de semillas

Las semillas se germinaron mediante cultivo *in vitro*. Para ello, éstas fueron envueltas en una malla cerrada con hilo y se les sometió a una serie de lavados para su desinfección. En primer lugar, la malla fue introducida durante 30 minutos en un bote que contenía 100 mL de agua destilada, 100 mL de lejía y 3-4 gotas del detergente Tween 20. A continuación se realizó una serie de agua en la que las semillas pasan por 3 botes que contienen agua destilada durante unos periodos de tiempo de 5, 10 y 15 minutos con el objetivo de ir eliminando progresivamente la lejía. Finalmente las semillas se sembraron en placas Petri de 14 cm de diámetro con papel de filtro y 14 mL de agua destilada. Todo este proceso se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar para mantener las condiciones de asepsia. Una vez sembradas, las placas permanecieron a 24 °C durante 48 horas en oscuridad y 48 horas más con presencia de luz, para posteriormente sembrarlas en tierra.

3.1.2. Condiciones de cultivo

Una vez germinadas las semillas, estas fueron cultivadas en el invernadero a una temperatura entre 20-26 °C, con una humedad relativa del 50-70 % y un fotoperiodo de día largo, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Cada semilla fue sembrada en macetas individuales (12 cm de profundidad x 13 cm de diámetro inferior) que contenían una mezcla de turba y perlita al 50 %. Las macetas fueron regadas de manera manual con solución nutritiva de Hoagland.

3.2. Material microbiológico

La bacteria empleada en el presente trabajo es la cepa virulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Δ *AvrPto* y fue cedida amablemente por la Dra. Selena Giménez del Centro Nacional de Biotecnología (CNAB, Madrid). Esta cepa se caracteriza por tener delecionado el gen de avirulencia *AvrPto*, por lo que no puede ser reconocido por el gen de resistencia *Pto* de dicha variedad de tomate, generando una interacción compatible y desencadenando la enfermedad.

3.3. Tratamientos con compuestos volátiles

Los tratamientos con los compuestos volátiles se llevaron a cabo con plantas Flora-Dade de entre 21 y 30 días. Dichas plantas permanecieron en el invernadero desde la siembra en maceta hasta su uso en el experimento, con las condiciones de cultivo previamente

descritas (apartado 3.1.2).

Los compuestos volátiles utilizados en los tratamientos de plantas de tomate confinadas en cámaras de metacrilato fueron el propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), el isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y el metil jasmonato (MJ) utilizados se muestran en la Figura 3.1.

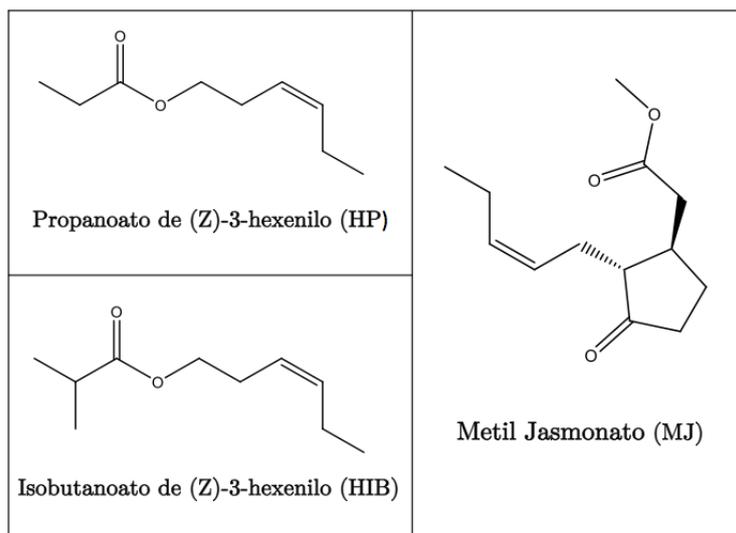


Figura 3.1: Estructura química de los compuestos volátiles empleados en los tratamientos de las plantas de tomate en cámaras de metacrilato.

3.3.1. Tratamiento con ésteres en cámaras de metacrilato

Se colocaron entre 2 y 4 plantas en cámaras de metacrilato de 45 ó 110 L. A partir de la densidad y la masa molecular de cada compuesto, se calculó el volumen necesario para obtener una concentración final de 5 μM de cada compuesto en cada cámara. Este volumen se distribuyó entre varios algodocillos hidrófilos.

Finalmente las cajas fueron selladas con vaselina y precintadas con papel de film transparente y cinta adhesiva, asegurando así una atmosfera cerrada y uniforme. Todos los tratamientos se hicieron de forma individual, es decir, cada caja de metacrilato contenía un único compuesto. Estas permanecieron 24 h cerradas y se abrieron en el momento de la toma de muestras.

3.4. Infecciones

Las plantas de tomate FD fueron inoculadas con la cepa bacteriana *Pst* ΔAvrPto , cuando presentaban la tercera y cuarta hoja lo suficientemente desarrolladas, es decir, al cabo de 25-30 días.

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

Tabla 3.1: Composición y preparación de 1L de medio de cultivo bacteriano LB agar.

Compuesto	Cantidad
LB agar (Pronadisa)	35 g
H ₂ O destilada	Hasta 1 L
AUTOCLAVAR (121 °C, 15 min)	
Kanamicina (100 mg/mL)	0.25 mL
Rifampicina (10 mg/mL)	10 mL
Espectinomicina (10 mg/mL)	2.5 mL

Tabla 3.2: Composición y preparación de 1L de medio de cultivo bacteriano King B líquido.

Compuesto	Cantidad
Proteosa peptona	10 g
K ₂ HPO ₄ destilada	1.5 G
Glicerol	15 g
H ₂ O destilada / Ajustar a pH 7	Hasta 1 L
AUTOCLAVAR (121 °C, 15 min)	
MgSO ₄ 1 M estéril	5 mL
Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL

3.4.1. Preparación del inóculo bacteriano

La bacteria, previamente almacenada en glicerol a -80 °C, fue crecida en oscuridad durante 48 horas a 28 °C en placas Petri de 90 mm de diámetro. Cada una de estas placas contenía 25 mL de medio LB agar (Pronadisa) con los antibióticos previamente descritos en la Tabla 3.1.

Tras observar el crecimiento de colonias, éstas se recogieron con puntas de pipeta y se sembraron en 3 mL de medio King B líquido (tabla 3.2) en tubos Falcon de 50 mL. Las bacterias se crecieron en agitación a 200-220 rpm y 28°C durante toda la noche. Después de 24h en agitación, 1 mL del cultivo bacteriano se pasó a otro tubo Falcon nuevo con 14 mL del mismo medio para refrescar la bacteria, promoviendo así un mejor crecimiento. En este paso las condiciones de crecimiento fueron las mismas que en el paso anterior.

Tabla 3.3: Composición y preparación de 1L de medio de cultivo bacteriano King B agar.

Compuesto	Cantidad
King B agar (King B Medium Pseudomonas F Agar USP)(Pronadisa)	37 g
Glicerol	15 g
H ₂ O destilada / Ajustar a pH 7	Hasta 1 L
AUTOCLAVAR (121 °C, 15 min)	
Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL

El cultivo bacteriano resultante se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm y el sedimento fue resuspendido en 20 mL de *MgCl*₂ 10 mM estéril. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm de una dilución 1:10, a partir de la cual se calculó el volumen de cultivo bacteriano y *MgCl*₂ 10 mM necesarios para obtener un inóculo final de densidad óptica de 0.1 a 600 nm (D.O.) que corresponde aproximadamente a 1×10^7 unidades formadoras de colonia por mililitro (c.f.u./mL; López-Gresa, en revisión).

3.4.2. Infección bacteriana

La infección se llevó a cabo por inmersión, sumergiendo las plantas hasta la base del tallo en una solución de *MgCl*₂ 10 mM con 0,5 mL de Silwet por cada litro de *MgCl*₂ y cultivo bacteriano a D.O. 0.1, durante 30 segundos.

3.5. Toma de muestra

Los folíolos de las hojas de tomate utilizados en cada uno de los experimentos se obtuvieron de la 3^a y 4^a hoja de cada planta de tomate. Cada folíolo o pareja de folíolos de cada hoja fueron empleados para un experimento determinado. En el caso de los experimentos de análisis de la expresión génica, los folíolos seleccionados correspondieron a la zona más próxima al tallo. Se recogieron en tubos Falcon de 50 mL, se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido y finalmente fueron almacenados a -80 °C hasta su posterior uso. Para el análisis de apertura estomática siempre se recogió siempre el folíolo del extremo. Por último, para los experimentos de conteo bacteriano y conductividad se tomaron los folíolos de la zona intermedia. En estos 3 últimos experimentos la muestra se recogió en fresco y se continuó cada experimento independientemente.

3.6. Estudio del crecimiento bacteriano

3.6.1. Conteo bacteriano en hoja de tomate

Esta técnica consiste en realizar un recuento de las unidades formadoras de colonias (c.f.u.) presentes en el material vegetal infectado.

Con la ayuda de un sacabocados se tomaron 3 discos de 1 cm^2 de los folíolos adecuados de cada planta y se sumergieron en tubos Eppendorf que contenían $300\ \mu\text{L}$ de MgCl_2 10 mM, de forma que cada tubo correspondía a una planta. Estos discos se trituraron en el homogeneizador *TissueLyser II* (Qiagen), introduciendo perlas de vidrio en el interior de cada uno de los tubos. A continuación, se añadieron otros $700\ \mu\text{L}$ de MgCl_2 10 mM, obteniendo así un volumen final de 1 mL. La mezcla se agitó con vórtex hasta su completa homogeneización, tras la cual se realizaron diluciones seriadas 1:10.

A continuación, se sembraron placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían King B agar previamente preparado. Estas placas fueron sembradas con $100\ \mu\text{L}$ de 4 diluciones seriadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , y 10^{-6}) y se extendieron con la ayuda de pequeñas esferas de vidrio. Tras la incubación de las placas a $28\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h, se realizó el recuento de colonias aisladas formadas con la ayuda de un contador de colonias (Selecta; Vidrafoc).

3.7. Medidas de apertura estomática

En primer lugar, se obtuvieron moldes del envés de los folíolos. Para ello se colocó una capa fina de pegamento líquido universal, dejándolo secar durante unos 5 minutos y despegándolo cuidadosamente con la ayuda de unas pinzas. A partir de estos moldes, se procedió a la visualización de los estomas a través del microscopio óptico. Para ello, se cortaron secciones planas de cada uno de los moldes y se colocaron en un portaobjetos, se hidrataron con agua destilada con ayuda de una pipeta Pasteur y se cubrieron con un cubreobjetos.

Mediante la técnica de microscópica de campo claro se pudo visualizar perfectamente los estomas de cada folíolo sin necesidad de teñir los moldes previamente. De cada muestra, se tomaron varias fotos que posteriormente fueron analizadas mediante el programa de análisis de imagen *Image J*. Se midió el ancho y alto de al menos 50 estomas por folíolo y por tipo de tratamiento de 3 plantas independientes, obteniendo así el ratio medio de apertura estomática de cada muestra (Figura 3.2).

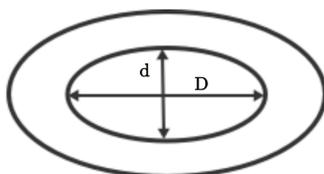


Figura 3.2: Representación de la medida del ancho (D) y el alto (d) de un estoma tipo.

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

3.8.1. Extracción del RNA total

La extracción de RNA de hojas de tomate se llevó a cabo mediante el método del Trizol (*Trizol*[®] Reagent)(*Ambion*[®] Life Technologies) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. Para evitar la degradación del material, las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso, y todas las centrifugaciones se realizaron a 4 °C. Al finalizar la extracción, el RNA se almacenó a -20 °C en un volumen final de 35 μL de agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato).

3.8.2. Cuantificación de RNA

Para la cuantificación del RNA extraído se empleó un espectrofotómetro ultravioleta-visible *Nanodrop*[®] ND-1000, calibrado con un blanco de agua DEPC. La concentración de RNA se calculó midiendo a una absorbancia a 260 nm.

Todos los RNAs analizados presentan valores comprendidos entre 1.8-2.0 para ratios de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ lo que indicaría una buena calidad de la muestra.

3.8.3. Precipitación de RNA con cloruro de litio (LiCl)

Las muestras de RNA extraídas y resuspendidas en 35 μL de H_2O se llevaron a un volumen de 200 μL y se añadió 1 volumen de LiCl 6M. A continuación, se dejaron en hielo durante 3 horas y se centrifugaron 15 minutos a 13.000 rpm a 4 °C, para que el RNA precipitara. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 1 volumen de LiCl 3M. Tras una nueva centrifugación de 15 minutos a 13.000 rpm a 4 °C, se eliminó de nuevo el sobrenadante y la muestra se resuspendió en 44 μL de H_2O DEPC.

3.8.4. Tratamiento con DNasa

Para eliminar posibles contaminantes de DNA genómico, se realizó un tratamiento con el enzima DNasa, utilizando para ello el kit comercial TURBO DNase (*Ambion*[®] Life Technologies). Para obtener un volumen de reacción de 50 μL , a los 44 μL de RNA obtenidos (ver apartado 3.8.3) se le añadieron 5 μL de tampón de reacción (10x TURBO DNase Buffer) y 1 μL del enzima TURBO DNase (2U/ μL). Tras incubar las muestras a 37 °C durante 30 minutos, se añadieron 5 μL de inactivador de DNasa (DNase Inactivation Reagent) y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 minutos para detener la reacción. Finalmente las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 2 minutos, y se transfirió el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf.

El RNA tratado con DNasa fue cuantificado empleando el espectrofotómetro *Nanodrop*[®] ND-1000 (apartado 3.8.2).

3.8.5. Retrotranscripción

Para obtener cDNA a partir de RNA, se utilizó el kit comercial *PrimeScript*TM RT Reagent Kit (Perfect Real Time) de Takara, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para un volumen de reacción de 10 μ L, se emplearon 1 μ g de RNA, 2 μ L de tampón (5x PrimeScript Buffer); 0,5 μ L de oligoDT Primer 50 μ M; 0,5 μ L de enzima retrotranscriptasa (PrimeScript RT enzymeMix I); y H_2O DEPC hasta obtener 10 μ L de volumen final. La mezcla se incubó a 37 °C durante 15 minutos en primer lugar, y a continuación durante 30 segundos a 85 °C.

Finalmente las muestras se colocaron en hielo y se diluyeron en una proporción 1:10 con H_2O DEPC, obteniendo así un volumen final de 100 μ L de cDNA. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

3.8.6. Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)

Este ensayo se llevó a cabo con el reactivo de *SYBR*[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para ello se empleó una placa de 96 pocillos *MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate* (Applied Biosystems), añadiéndose 10 μ L a cada pocillo. Se realizaron 3 repeticiones técnicas de cada réplica biológica de cDNA. Se selló la placa cuidadosamente evitando dejar burbujas de aire, y se dio un spin de centrifuga antes de introducirla en el equipo de PCR cuantitativa correspondiente.

La amplificación fue monitorizada a tiempo real con el sistema de PCR en tiempo real 1500 Fast (Life Technologies). El software empleado para analizar los resultados fue la versión 2.0.4 del mismo equipo. Como control positivo del experimento, se utilizó en todos los casos el gen Factor de elongación 1 alfa (*eEF1 α*). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se recogen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Oligonucleótidos empleados como cebadores en los experimentos de qRT-PCRs.

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
<i>PR1</i>	5' ACTCAAGTAGTCTGGCGCAACTCA 3'	5' AGTAAGGACGTTGTCCGATCGAGT 3'
<i>P23</i>	5' TTCGAGGTACGCAACAACACTG 3'	5' ATGCATTGATGACCCATGTTT 3'
<i>JAZ3</i>	5' TTCCCTGCTGACAAAGCTAGAGCA 3'	5' AGGGTGCAGATGAAACTGATCCGA 3'
<i>JAZ7</i>	5' TTGCTATGGCTCGTAGAGCAACTC 3'	5' TTTGCCAATGAACGCTTGACGACG 3'
<i>TCI21</i>	5' ACTCGTCCTGTGCTTTGTCC 3'	5' CCCAAGAGGATTTTCGTTGA 3'
<i>MYB60</i>	5' ACATGGTCCTGGAAATTGGA 3'	5' TTTGATTCTTGGCCTCAAGT 3'
<i>eEF1α</i>	5' CCACCTCGAGATCCTAAGG 3'	5' ACCCTCACGTATGCTTCCAG 3'

3.9. Ensayos de inhibición bacteriana en placa

Para llevar a cabo el estudio del posible efecto antibiótico de diferentes compuestos volátiles, se partió de un inóculo de la cepa DC3000 Δ *AvrPto* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Tras el cultivo bacteriano en medio LB agar previamente descrito, las colonias fueron recogidas con puntas de pipeta y sembradas en 15 mL de King B líquido. Las bacterias fueron crecidas en condiciones de agitación a 200-220 rpm y temperatura de 28°C durante toda la noche.

A partir del cultivo bacteriano, se pipeteó 1 mL de bacteria por cada 14 mL de King B agar caliente. Tras homogeneizar cuidadosamente para evitar la formación de burbujas, la mezcla del cultivo bacteriano con King B agar fue vertida en placas Petri de 90 mm de diámetro. Una vez solidificado y con la ayuda de pinzas estériles, se colocaron sobre la superficie del agar discos de papel Whatman de 1.5 mm de grosor y 5 mm de diámetro (GB005 Blotting Paper, SchleicherSchuell). Por cada disco, se pipetearon 10 μ L de soluciones a diferentes porcentajes (50-100 %) de cada uno de los compuestos volátiles seleccionados (propanoato de (*Z*)-3-hexenilo, butirato de (*Z*)-3-hexenilo, isobutirato de (*Z*)-3-hexenilo, acetato de (*Z*)-3-hexenilo, (*Z*)-3-hexenal, (*E*)-2-hexenal y metil jasmonato) disueltos en metanol. Como control negativo se utilizó metanol, y como control positivo el antibiótico bacteriostático tetraciclina, a una concentración de 0.785 % (p/v) y 0.3925 % (p/v) respectivamente.

Tras un periodo de 48 h a 28°C, se comprobó el crecimiento de la bacteria en la superficie del agar, y se midieron los halos de inhibición de crecimiento alrededor de los discos mediante un pie de rey.

3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico empleado para comparar dos tipos de muestras se llevó a cabo mediante una prueba *t* de Student, utilizando las herramientas estadísticas incluidas en el programa MS Excel de la *suite* Microsoft Office. En todos los análisis, un *p-value* < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

En este trabajo se pretende confirmar el papel defensivo de distintos ésteres de (*Z*)-3-hexenilo mediante el análisis de sus propiedades defensivas directas, estudiando sus propiedades antibacterianas y mediante la investigación de su posible implicación defensiva de manera indirecta. Para estudiar este último caso se llevarán a cabo distintos tratamientos exógenos con dichos VOCs y se estudiará el comportamiento defensivo frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tomato*.

4.1. Estudio del papel defensivo directo de los VOCs

Para estudiar la posible función defensiva de los distintos compuestos volátiles que se acumulan diferencialmente en plantas de tomate tras una infección bacteriana, se evaluó el posible efecto antibiótico que pudieran tener por sí mismos.

Para confirmar este efecto, diferentes compuestos volátiles de hoja verde tales como (*Z*)-3-hexenal, (*E*)-2-hexenal, propanoato de (*Z*)-3-hexenilo, butanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HB), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y acetato de (*Z*)-3-hexenilo (HA), fueron empleados a distintas concentraciones con el objetivo de observar la inhibición del crecimiento bacteriano en la placa sembrada con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Δ *AvrPto*. Asimismo, se estudió el posible papel antimicrobiano del jasmonato de metilo, molécula señal clave de la respuesta defensiva de las plantas frente a insectos y patógenos necrótrofos (Zhang *et al.*, 2017). Se utilizó como control positivo el antibiótico tetraciclina debido a su amplio rango de acción frente a diferente microorganismos (Chopra y Roberts, 2001), y como control negativo metanol por ser el disolvente empleado para hacer las diluciones de los compuestos.

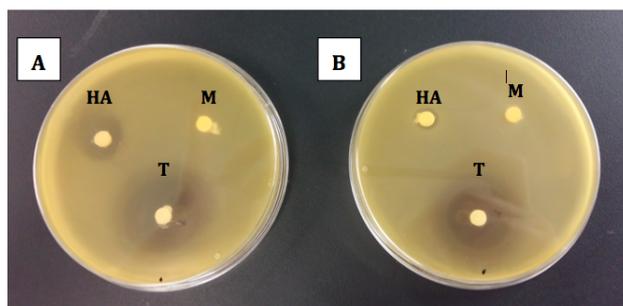


Figura 4.1: Inhibición de crecimiento bacteriano en placas de King B agar. Actividad antimicrobiana *in vitro* de los compuestos acetato de (*Z*)-3-hexenilo (HA), tetraciclina (T) y metanol (M). **(A)** Concentración de HA 100 % (v/v) y 0.785 (p/v) en el caso de T. **(B)** Concentración de HA 50 % (v/v) y 0.395 (p/v) de T.

La Figura 4.1 muestra una imagen representativa del ensayo de inhibición del crecimiento para el caso concreto del HA, a dos concentraciones distintas. Del mismo modo, se llevó a cabo el estudio para el resto de VOCs, y los datos quedan recogidos en la Tabla 4.1, que muestra únicamente aquellos compuestos y concentraciones en las que se observó halo de inhibición. Tal y como se aprecia en la tabla, los únicos compuestos en los que se observó halo de inhibición fueron el HA y el (*E*)-2-hexenal, ya que en el resto de los casos no se detectó ningún tipo de inhibición ni a una concentración del 100 % (v/v) y dispensando el doble de volumen.

Tabla 4.1: Actividad antibiótica *in vitro* de distintos VOCs.

	% (v/v)	Zona inhibición (cm)	SD
Tetraciclina	0.785*	2.917	0.764
	0.395*	1.8	0.4249
Acetato de (<i>Z</i>)-3-hexenilo	100	0.867	0.029
	50	0.617	0.028
(<i>E</i>)-2-hexenal	100	7.05	0.173

*En este caso las unidades son (p/v)

El aldehído (*E*)-2-hexenal es el compuesto que muestra una mayor actividad antibiótica, tal y como corroboran distintos estudios, que lo califican como el compuesto que presenta mayor actividad bactericida *in vitro* dentro de grupo de las oxilipinas (Prost *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que tras infectar una planta con *Pseudomonas syringae* este compuesto es inducido en diferentes especies vegetales, como judía, tabaco y *Arabidopsis*. Sin embargo, su función no está descrita completamente ya que se ha comprobado que la aplicación exógena de este compuesto en ciertos mutantes de *Arabidopsis* que no sintetizan GLVs aumenta la susceptibilidad frente al ataque de patógenos (Scala *et al.*, 2013).

Respecto al éster HA, se puede apreciar un ligero aumento de inhibición de crecimiento bacteriano al aumentar la concentración. Aunque su efecto defensivo directo no está muy estudiado, se sabe que este compuesto juega un papel crucial en la defensa indirecta de las plantas frente a un amplio rango atacantes. Este compuesto está implicado en funciones tales como proteger a plantas frente a ataque de herbívoros atrayendo a los enemigos naturales de estos invasores; participar en la respuesta defensiva frente a hongos tales como *Botrytis cinerea*; evitar la expansión de virus, como el virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV); así como alertar a las plantas vecinas del ataque de organismos para que éstas activen sus mecanismos de defensa (ul Hassan *et al.*, 2015).

Los resultados de este estudio demuestran la actividad antibiótica *in vitro* de los GLVs acetato de (*Z*)-3-hexenilo y (*E*)-2-hexenal frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Δ *AvrPto*, siendo este último compuesto el que presenta una mayor actividad. Estos resultados confirman el papel defensivo de estos compuestos, actuando directamente sobre la bacteria y pudiendo frenar de alguna forma su avance.

4.2. Estudio del comportamiento estomático y de la inducción de rutas de señalización defensivas mediante el tratamiento de plantas de tomate con VOCs

Siguiendo con el objetivo de conocer mejor el posible papel defensivo de los GLVs objeto de este estudio, se seleccionaron los compuestos propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP) e isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB), ambos emitidos diferencialmente por las plantas de tomate Flora-Dade tras la infección bacteriana y hasta la fecha no estudiados en profundidad en nuestro laboratorio. Asimismo, se realizaron tratamientos con jasmonato de metilo (MJ) que, como se ha comentado anteriormente, es una molécula señal clave de la respuesta defensiva de las plantas (Zhang *et al.*, 2017). Para llevar a cabo este experimento se trataron plantas de tomate FD con los compuestos citados y se analizó el comportamiento de los estomas y la inducción de genes defensivos.

4.2.1. Efecto de los compuestos volátiles sobre el cierre estomático

Con el objetivo de estudiar si los compuestos volátiles HP, HIB y MJ tienen algún efecto en el cierre estomático, se analizó el ratio de apertura estomática de plantas tratadas con cada uno de los compuestos transcurridas 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.2.

Tal y como se puede observar, los tratamientos con HIB y HP provocaron un cierre estomático muy significativo, disminuyendo casi a la mitad el ratio de apertura estomática de la planta tratada en el caso de HP. Por el contrario, los tratamientos con MJ no afectaron apenas a este factor.

Recientemente, en nuestro laboratorio se ha identificado el butanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HB), un compuesto también perteneciente a la familia de los ésteres de (*Z*)-3-hexenol que está activamente implicado en el cierre estomático (Ozáez, 2017; Lisón *et al.*, 2017). De hecho, plantas tratadas con HB llegaban a alcanzar un ratio de apertura estomática similar al de una planta sometida a una infección bacteriana. Los resultados obtenidos en este proyecto se suman a los previamente obtenidos y refuerzan la importancia de los compuestos volátiles en la respuesta defensiva de las plantas.

La hormona vegetal por excelencia implicada en el cierre estomático es el ácido abscísico (ABA) y, en menor medida, el ácido jasmónico (Huang *et al.*, 2008). Se ha descrito que al tratar exógenamente plantas de *Arabidopsis* con ácido jasmónico, se activa todo un conjunto de cascadas de señalización que conllevan al cierre de los estomas (Daszkowska-Golec and Szarejko, 2013). Dichos resultados contrastan con los obtenidos en el presente estudio, en el que al aplicar exógenamente MJ en plantas de tomate el ratio de apertura

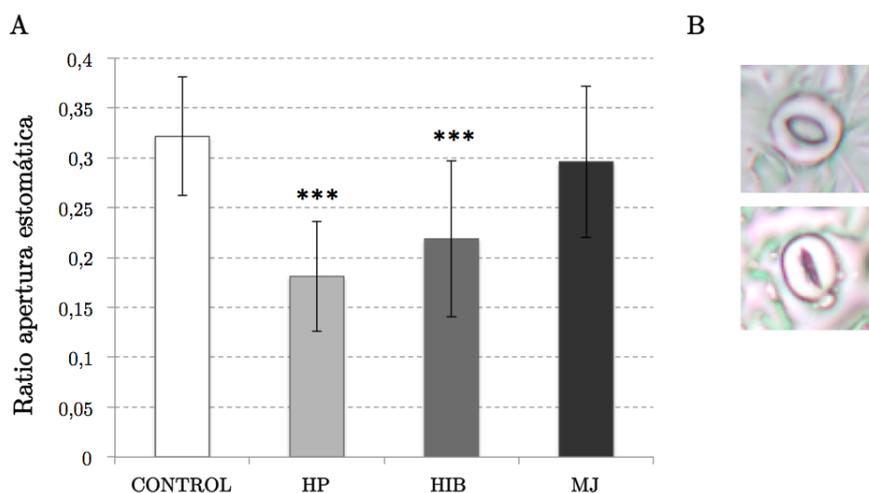


Figura 4.2: Ratio de apertura estomática de plantas de tomate Flora-Dade tratadas con propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y metil jasmonato (MJ). (A) Índice de apertura estomática en hojas de tomate 24 horas después del tratamiento en cámaras de metacrilato con HP, HIB, MJ y agua en el caso del control. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los ratios corresponden a la media \pm el error estándar de al menos 50 estomas correspondientes a 3 plantas independientes de un experimento representativo. El triple asterisco (***) indica que existe una significación estadística con un *p-value* < 0.001 entre las plantas control y las plantas tratadas. (B) Imagen correspondiente a estomas representativos de una planta control y una planta tratada con HP, respectivamente.

estomática apenas se ve afectado. Además, se ha analizado que el efecto del MJ es dependiente al ABA, puesto que tratamientos con MJ de mutantes de *Arabidopsis aba2-2* deficientes en ABA, no disminuyen el ratio de apertura estomática, mientras que cuando estos mutantes son tratados con una mezcla de ABA y MJ a concentraciones similares, el cierre estomático se observa claramente (Hossain *et al.*, 2011). Podría ocurrir que el tratamiento con MJ no fuera eficaz en plantas de tomate, quizás porque no existan los niveles de ABA necesarios. Estos datos ponen en manifiesto la falta de conocimiento de rutas de señalización activadas por fitohormonas, y su actuación en los mecanismos de defensa en las distintas especies vegetales.

Para profundizar en este terreno, se llevó a cabo el estudio de la expresión de genes marcadores de cierre estomático, como el gen *MYB60* (Cominelli *et al.*, 2005) mediante RT-PCR cuantitativa. Los resultados se pueden apreciar en la Figura 4.3.

Tras la exposición a los VOCs, se observó una represión génica de *MYB60* en aquellas muestras tratadas con HP y, en menor medida, con HIB. De nuevo, en el caso de las plantas tratadas con MJ, la expresión de *MYB60* fue similar a las plantas control.

MYB60 fue descrito por primera vez en *Arabidopsis*, donde se observó que frente a situaciones de estrés, como sequía o ataque de patógenos, o al rociar plantas con ABA, este gen se inhibía y ocasionaba el cierre estomático. Para confirmar su función, se obtuvieron mutantes knockout (*atmyb60-1*) que carecían del gen. El ratio de apertura estomática de estos mutantes resultó ser un 30 % menor que los estomas de las plantas control (Cominelli

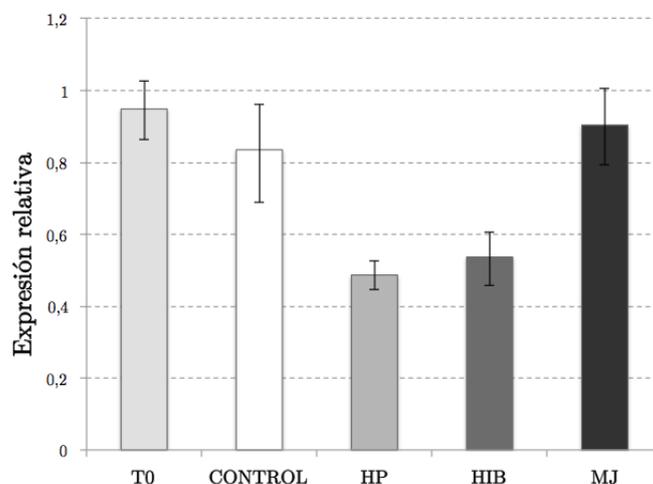


Figura 4.3: Expresión del gen *MYB60* en plantas de tomate Flora-Dade tratadas con propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y metil jasmonato (MJ). Nivel de expresión de *MYB60* en plantas de tomate FD 24 horas después de realizarse tratamientos con HP, HIB, MJ y agua en el caso del control. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor de elongación 1 alfa (*eEF1 α*). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de tres plantas de un experimento representativo. No hay significación estadística entre las plantas tratadas y las control.

et al., 2005). Recientemente, se han descrito los ortólogos de este gen en especies como tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Baldoni *et al.*, 2015) permitiéndonos estudiar la inducción de este gen en plantas de tomate tras el tratamiento con los VOCs. Así pues, nuestros resultados de represión de *MYB60* correlacionarían perfectamente con el ratio de apertura estomática obtenido en análisis anteriores (Figura 4.2), confirmando que HP y HIB producen el cierre estomático, mientras que MJ no parece producir ningún efecto.

4.2.2. Inducción de rutas de señalización defensivas tras la aplicación de compuestos volátiles

La inducción de defensas en las plantas está mediada por complejas rutas de señalización en las que hormonas vegetales como el ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA) juegan un papel importante. De manera general, la ruta dependiente de SA está asociada con respuestas defensivas frente patógenos biótropos, mientras que la ruta de JA está implicada en la regulación de defensas frente a herbívoros. Además, estas dos rutas de señalización normalmente actúan de manera antagonista, lo que sugeriría que el sistema inmune de las plantas sigue un modelo binario, en el que estas dos hormonas tendrían roles contrarios (Bari and Jones, 2009).

Para intentar averiguar a través de qué ruta de señalización actúan los compuestos HP, HIB y MJ, una vez realizados los tratamientos con dichos compuestos, se tomaron muestras de las plantas de tomate y se analizó cuantitativamente la expresión de genes marcadores de cada una de estas vías.

Para evaluar la respuesta defensiva mediada por JA, se emplearon los genes marcadores *JAZ3*, *JAZ7* y *TCI21* (Ishiga et al., 2013; Lisón et al., 2016). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.4.

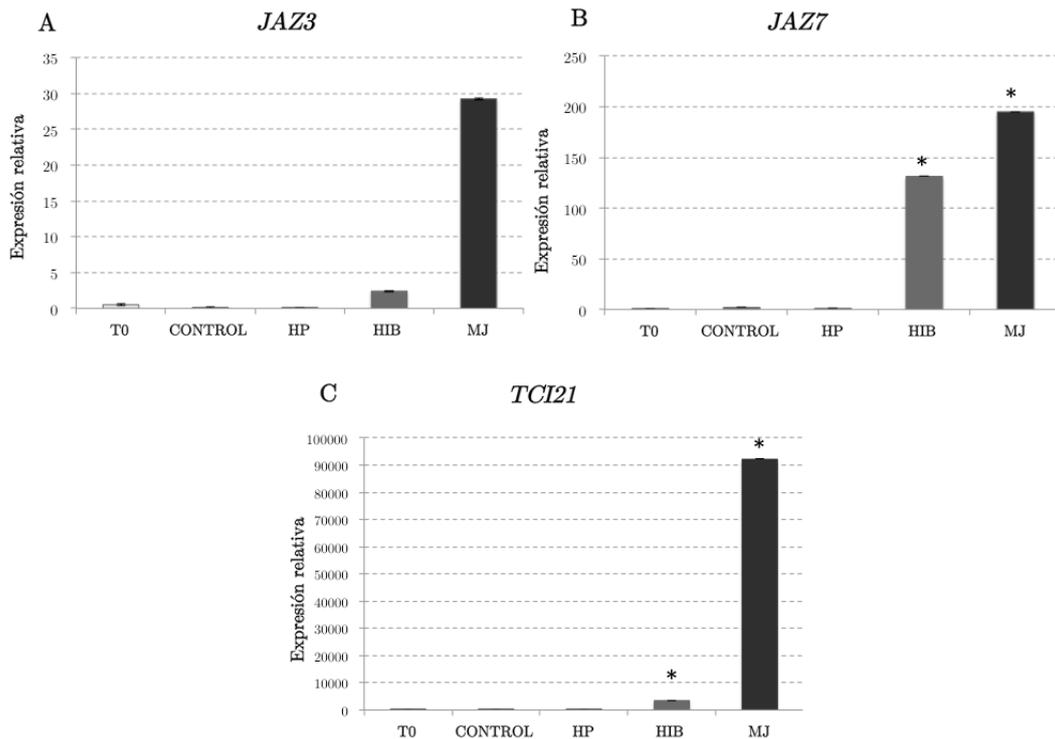


Figura 4.4: Expresión de los genes *JAZ3*, *JAZ7*, *TCI21* de plantas de tomate Floradade tratadas con propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y metil jasmonato. (A) Niveles de expresión de los genes *JAZ3*, (B) *JAZ7* y (C) *TCI21* en plantas de tomate FD a tiempo 0 y 24 horas después de realizarse tratamientos con HP, HIB, MJ y agua en el caso del control. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor de elongación 1 alfa (eEF1 α). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) indica que existe una significación estadística con un *p-value* < 0.05 entre las plantas control y las plantas tratadas.

Tal y como cabría esperar, las plantas tratadas con MJ presentan niveles altos de expresión de los genes *JAZ* y *TCI21*, mientras que en las plantas control y las tratadas con HP presentan unos niveles mínimos. Asimismo, se pudo observar que los tratamientos con HIB indujeron la expresión de los genes *JAZ* y *TCI21*. Estos resultados sugieren que la aplicación exógena de HIB podría activar la ruta del JA, mientras que el HP actuaría de una manera independiente a JA.

Las proteínas JAZ (*Jasmonate Zip Domain*) tienen un papel fundamental en la ruta de señalización mediada por JA, ya que una vez el MJ es reconocido por la célula vegetal, estas proteínas inducen la expresión de una serie de genes que activarán la respuesta de-

SECCIÓN 4.2. *Estudio del comportamiento estomático y de la inducción de rutas de señalización defensivas mediante el tratamiento de plantas de tomate con VOCs*

fensiva inducida por JA (Pauwels and Goossens, 2011). Además, estos genes se expresan de manera diferencial en plantas sometidas a la infección por patógenos necrótrofos o el ataque de herbívoros. Así pues, se ha descrito que *TCI21* (*Tomato Chymotrypsin Inhibitor 21*) es inducido por herida y MJ en hojas de tomate (Lisón et al., 2006), considerándose como un gen marcador de la respuesta final mediada por JA. Por tanto, la activación de los genes *JAZ* y *TCI21* puede considerarse como característica de la ruta de JA.

En el caso concreto de infección causada por la bacteria *Pseudomonas syringae*, se ha descrito tanto en tomate como *Arabidopsis* que esta bacteria es capaz de sintetizar la molécula conocida como coronatina (COR), que es análoga al MJ. La coronatina actúa uniéndose a los receptores de MJ, induciendo la síntesis de los genes *JAZ* y activando una serie de cascadas de señalización que conllevan la inhibición de la respuesta defensiva mediada por SA y el cierre estomático, lo que acarrearía una mayor entrada de la bacteria, aumentando así el daño causado a la planta (Elizabeth and Bender, 2007). Por estos motivos, la activación de la ruta de señalización de JA inducida por coronatina puede postularse como el principal factor de virulencia y patogenicidad de la bacteria *Pst* DC3000 (Ishiga et al., 2013).

Recientemente se ha descrito un co-receptor de COR, *JAZ2*, perteneciente a esta familia de genes. Este receptor presente en las células estomáticas regula su apertura a través de una serie de cascadas de señalización como se ha comentado previamente. Esta ruta se puede ver afectada por la presencia de COR, que actúa degradando a *JAZ2*, activándose así la ruta del JA que induce a la apertura estomática. La función de este receptor ha sido comprobada mediante plantas de *Arabidopsis* que presentan una mutación dominante de este gen, que evita la apertura estomática por parte de COR, proporcionando así una mayor resistencia frente a la infección bacteriana. De manera contraria, plantas de *Arabidopsis* que carecen de este gen son mucho más susceptibles a *Pseudomonas syringae* (Gimenez-Ibanez et al., 2016).

Nuestros resultados parecen indicar que únicamente HIB podría producir la activación de la ruta de JA, aunque la implicación de la activación de esta ruta y el cierre estomático no parece que esté del todo clara, pues los tratamientos con MJ en tomate no producen efecto sobre los estomas (Figuras 4.2.2 y 4.3).

Como genes marcadores de la ruta dependiente de SA, se analizó la expresión de los genes *PR1* y *P23* tras los tratamientos de plantas de tomate con los VOCs (Figura 4.5).

Como se puede apreciar, la inducción de estos genes de defensa por parte de HP y, en menor medida, de HIB fue estadísticamente significativa, siendo aún mayor la expresión en el caso de *PR1*. Tal y como cabría esperar, la inducción de estos genes de defensa por parte del MJ resultó ser mínima.

La inducción de proteínas *PR* es uno de los principales eventos bioquímicos que se activan en las plantas cuando estas son infectadas por patógenos como virus, viroides, bacterias u hongos. La inducción de este tipo de proteínas conlleva la acumulación de metabolitos que actúan a su vez como inductores de genes de defensa.

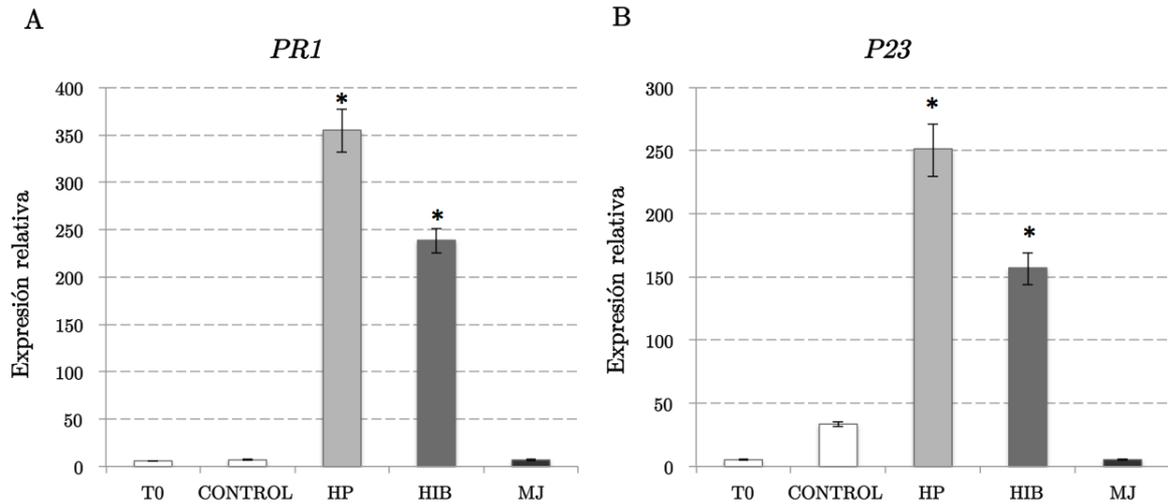


Figura 4.5: Expresión de los genes *PR1* y *P23* de plantas de tomate Flora-Dade tratadas con propanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y metil jasmonato (MJ). (A) Niveles de expresión de *PR1* y (B) *P23* en plantas de tomate FD a tiempo 0 y 24 horas después de realizarse tratamientos con HP, HIB, MJ y agua en el caso del control. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del factor de elongación 1 alfa ($eEF1\alpha$). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de tres plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) indica que existe una significación estadística con un p -value < 0.05 entre las plantas control y las plantas tratadas.

Ya en nuestro laboratorio se había descrito la inducción de *PR1* y *P23* de una manera muy significativa tras el tratamiento con butanoato de (*Z*)-3-hexenilo (Ozáez, 2017). En este trabajo hemos analizado que HP produce unos niveles de inducción de *P23* muy superiores a los producidos por el HB.

Se ha descrito que tratamientos exógenos con compuestos que producen la activación de estas proteínas PRs llevan consigo una mayor resistencia a infecciones posteriores (Campos *et al.*, 2014; Ozáez, 2017).

De este modo, nuestros resultados parecen indicar que HP y HIB podrían actuar como inductores de la respuesta defensiva en plantas, pudiendo aumentar la resistencia de plantas tratadas frente a patógenos.

4.3. Estudio del efecto de los compuestos volátiles en la inducción de resistencia frente a infección bacteriana con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Δ *AvrPto*

El último de los objetivos planteados en este proyecto fue estudiar la resistencia de plantas de tomate Flora-Dade a la infección con la bacteria *Pst* tras 24 horas después de haber tratado las plantas con los compuestos HP, HIB y MJ. El objetivo de este apartado

SECCIÓN 4.3. *Estudio del efecto de los compuestos volátiles en la inducción de resistencia frente a infección bacteriana con Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 ΔAvrPto*

es comprobar si la inducción de genes de defensa y el cierre estomático se relaciona con el aumento de la resistencia de las plantas tratadas frente a una infección bacteriana.

4.3.1. Influencia de tratamientos VOCs sobre el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae*

Las plantas tratadas con los VOCs fueron infectadas con la bacteria *Pst* y se llevó a cabo el conteo bacteriano a partir de hojas infectadas y tratadas con los diferentes compuestos 24 horas después de la infección.

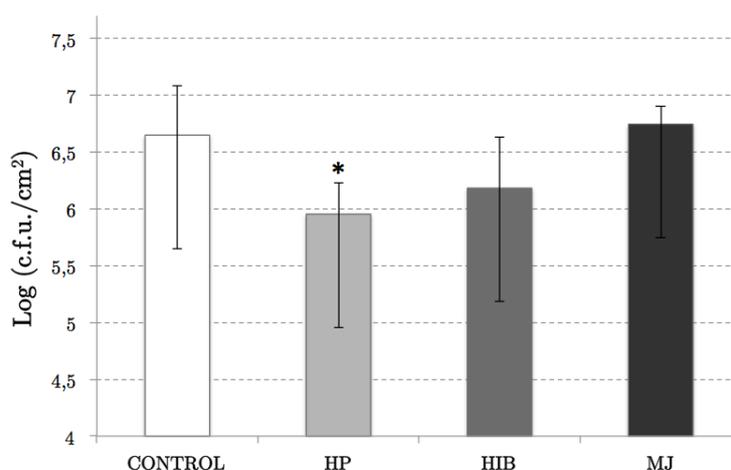


Figura 4.6: Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Δ *AvrPto* en hojas de plantas de tomate Flora-Dade control y de plantas Flora-Dade pre-tratadas con propenoato de (*Z*)-3-hexenilo (HP), isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HIB) y metil jasmonato (MJ) 24h post-infección. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar de 4 plantas independientes de un experimento representativo. El asterisco (*) indica que existe una diferencia significativa de las plantas pre-tratadas con HP respecto a las plantas control, con un *p-value* < 0.05.

Como se puede apreciar en la Figura 4.6, el tratamiento con HP disminuyó significativamente el número de c.f.u. en los tejidos infectados, lo que indicaría una mayor resistencia de las plantas pre-tratadas frente a la bacteria *Pst*. Los tratamientos con HIB también disminuyeron el c.f.u, aunque no de manera significativa.

Varios estudios han analizado el efecto de tratamientos exógenos con compuestos volátiles frente a esta bacteria en diferentes especies vegetales. Podríamos destacar el aumento de resistencia frente a *Pst* en plantas de pepino tras realizar tratamientos con 3-pentanol y 2-butanona (Song and Ryu, 2013); o tratamientos con un precursor de etileno, el ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) en *Arabidopsis*, en los que se detectó una reducción de más del 50% de los síntomas ocasionados por *Pst* (Pieterse *et al.*, 1998). En nuestro laboratorio también se comprobó que el tratamiento con el monoterpeno α -terpineol (Kabbas, 2015) y con el éster butanoato de (*Z*)-3-hexenilo (Ozáez, 2017; Lisón *et al.*, 2017) inducían notoriamente resistencia frente a esta bacteria.

De nuevo, en el tratamiento con MJ se observaron unos resultados similares a los

obtenidos en las plantas control. Este resultado discrepa con otros estudios en los que tratamientos con MJ en *Amaranthus cruentus* (Casarrubias-Castillo, *et al.*, 2014) o en *Arabidopsis* (Pieterse *et al.*, 1998) conferirían una mayor resistencia a las plantas. Esto señala de nuevo la diferencia existente en los mecanismos defensivos entre distintas especies vegetales.

Una vez estudiados todos estos factores, se podría confirmar el papel de HP, y en menor medida de HIB, como compuestos volátiles que tienen un papel defensivo en las plantas, ya que estos compuestos inducen la síntesis de proteínas de defensa, promueven el cierre estomático y por lo tanto, confieren una mayor resistencia frente a la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Δ *AvrPto* en plantas de tomate.

4.4. Perspectivas futuras

En este Trabajo Fin de Grado se ha estudiado el papel defensivo de ciertos GLVs que se acumulan de manera diferencial en plantas de tomate infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *AvrPto*.

En primer lugar, se ha estudiado la actividad antibiótica de varios compuestos volátiles sobre la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Δ *AvrPto*. Estos ensayos confirmaron que los únicos compuestos que presentaban actividad antibiótica contra la bacteria *per se* eran el (*E*)-2-hexenal y el acetato de (*Z*)-3-hexenilo.

Por otra parte, se ha evaluado la capacidad de inducir respuesta defensiva de 2 GLVs en concreto, HP y HIB, mediante su aplicación exógena. En este apartado cabe destacar al compuesto HP, y en menor medida HIB, como compuestos volátiles capaces de inducir genes defensivos en plantas de tomate, el cierre estomático y aumentar la resistencia frente a una infección bacteriana, reforzando así la importancia de los compuestos volátiles en el sistema defensivo de las plantas.

Como se ha citado en apartados anteriores, las principales moléculas señal de la respuesta defensiva de las plantas son el SA y el JA, aunque otras hormonas tales como el ABA o el etileno (ET) también juegan un papel clave en su sistema inmune. Resultaría interesante profundizar en el estudio de las vías de señalización sobre las que actúan estos VOCs. Para ello, además de estudiar la activación de genes marcadores de cada una de las vías, tal y como se ha hecho para el caso del SA o JA, podría estudiarse el efecto de los tratamientos sobre plantas transgénicas o mutantes naturales que carecieran de cada una de estas hormonas, a saber, plantas transgénicas *NahG* incapaces de acumular SA (Achuo *et al.*, 2004), mutantes *Never ripe*, insensibles al ET, (Lanahan *et al.*, 1994), mutantes *Jai*, incapaces de percibir JA (Li *et al.*, 2004) y mutantes *flacca*, deficientes en ABA (Muñoz-Espinoza *et al.*, 2015).

Así mismo, estos resultados podrían servir para desarrollar un nuevo producto inductor del cierre estomático, cuyo componente básico fuera el HP, o bien realizar una combinación junto al compuesto volátil HB previamente patentado en nuestro laboratorio (Lisón *et al.*, 2017). Esta combinación podría potenciar aún más su función, tanto como

de inductor de resistencia a patógenos, o de resistencia frente a factores abióticos como la sequía. Este producto podría presentarse como una alternativa a los plaguicidas químicos convencionales o a compuestos implicados en el cierre estomático como el ABA, reduciendo considerablemente los costes o la contaminación ambiental. Además sería interesante realizar tratamientos exógenos en varias especies vegetales de interés agronómico, para conocer si este producto tuviera un mayor rango de actuación.

Otra opción sería estudiar si la emisión de estos compuestos volátiles es capaz de alertar a plantas vecinas de la presencia de patógenos en el entorno. Esta “comunicación” entre plantas se describió por primera vez en el caso del MJ, en el que se comprobó que plantas que estaban siendo atacadas por herbívoros alertaban a las plantas de su alrededor del peligro mediante la síntesis de este compuesto, el cual inducía la síntesis de inhibidores de proteasas haciendo a las plantas resistentes frente al posible ataque de estos enemigos (Farmer and Ryan, 1990). Este fenómeno se ha descrito también frente al ataque de patógenos y en diferentes especies vegetales alejadas taxonómicamente como *Arabidopsis thaliana*, maíz (*Zea mays*), arce (*Acer saccharum*), artemisa (*Artemisia tridentata*), y tabaco (*Nicotiana attenuata*) (Yi *et al.*, 2009).

Finalmente como aplicación biotecnológica directa se podrían diseñar plantas transgénicas capaces de aumentar la emisión de estos GLVs y comprobar si estas plantas son más resistentes a plagas, a sequía y son capaces de alertar a las plantas vecinas frente a una ataque de herbívoros o patógenos.

5

Conclusiones

- I . Los GLVs (*E*)-2-hexenal y acetato de (*Z*)-3-hexenilo pueden considerarse como metabolitos defensivos directos, ya que presentan actividad antibiótica *in vitro* frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Δ *AvrPto*.

- II . Los tratamientos en cámara cerrada de plantas de tomate con propanoato de (*Z*)-3-hexenilo y en menor medida con isobutanoato de (*Z*)-3-hexenilo inducen la expresión de los genes implicados en la respuesta defensiva de las plantas *PR1* y *P23*, aumentan el ratio de cierre estomático y mejoran la resistencia de las plantas a la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Δ *AvrPto*, confirmando así el papel defensivo de estos VOCs y pudiendo, por tanto, ser considerados como inductores de resistencia.

6

Bibliografía

- Achuo, E., Audenaert, K., Meziane, H. and Hofte, M. (2004). The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology*, 53(1), pp.65-72.
- Anderson, J., Gleason, C., Foley, R., Thrall, P., Burdon, J. and Singh, K. (2010). Plants versus pathogens: an evolutionary arms race. *Functional Plant Biology*, 37(6), pp. 499-512.
- Ausubel, F. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nature Immunology*, 6(10), pp.973-979.
- Baldoni, E., Genga, A. and Cominelli, E. (2015). Plant MYB Transcription Factors: Their Role in Drought Response Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), pp.15811-15851.
- Bari, R. and Jones, J. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), pp.473-488.
- Beattie, G. and Lindow, S. (1995). The Secret Life of Foliar Bacterial Pathogens on Leaves. *Annual Review of Phytopathology*, 33(1), pp.145-172.
- Bektas, Y. and Eulgem, T. (2015). Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Boller, T. y Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), pp.379-406.
- Campos, L., Granell, P., Tárraga, S., López-Gresa, P., Conejero, V., Bellés, J., Rodrigo, I. and Lisón, P. (2014). Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*, 77, pp.35-43.
- Cardoza, Y. and Tumlinson, J. (2006). Compatible and Incompatible Xanthomonas Infections Differentially Affect Herbivore-Induced Volatile Emission by Pepper Plants. *Journal of Chemical Ecology*, 32(8), pp.1755-1768.
- Casarrubias-Castillo, K., Martínez-Gallardo, N. and Délano-Frier, J. (2014). Treatment of *Amaranthus cruentus* with chemical and biological inducers of resistance has contrasting effects on fitness and protection against compatible Gram positive and Gram negative bacterial pathogens. *Journal of Plant Physiology*, 171(11), pp.927-939.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J., Felix, G. and Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448(7152), pp.497-500.
- Chopra, I. and Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), pp.232-260.
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S. and Tonelli, C. (2005). A Guard-Cell-Specific MYB Transcription Factor Regulates Stomatal Movements and Plant Drought Tolerance. *Current Biology*, 15(13), pp.1196-1200.
- Conrath, U. (2006). Systemic Acquired Resistance. *Plant Signaling Behavior*, 1(4), pp.179-184.
- Corwin, J. and Kliebenstein, D. (2017). Quantitative Resistance: More Than Just Perception of a Pathogen. *The Plant Cell*, 29(4), pp.655-665.
- D'Auria, J., Pichersky, E., Schaub, A., Hansel, A. and Gershenzon, J. (2006). Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (*Z*)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 49(2), pp.194-207.
- Daszkowska-Golec, A. and Szarejko, I. (2013). Open or Close the Gate – Stomata Action Under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Delaney, K., Breza-Boruta, B., Lemańczyk, G., Bocianowski, J., Wrzesińska, D., Kalka, I. and Piesik, D. (2015). Maize Voc Induction after Infection by the Bacterial Pathogen, *Pantoea ananatis*, Alters Neighbouring Plant Voc Emissions. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 122(3), pp.125-132.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. and Orlova, I. (2006). Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(5), pp.417-440.

- Duradeva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. and Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1), pp.16-32.
- Elizabeth, S. and Bender, C. (2007). The phytotoxin coronatine from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 functions as a virulence factor and influences defence pathways in edible brassicas. *Molecular Plant Pathology*, 8(1), pp.83-92.
- Farmer, E. and Davoine, C. (2007). Reactive electrophile species. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), pp.380-386.
- Farmer, E. and Ryan, C. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), pp.7713-7716.
- Ferrari, S., Savatin, D., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 4, pp.4-49.
- Flor, H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), pp.275-296.
- Fu, Y., Yin, H., Wang, W., Wang, M., Zhang, H., Zhao, X. and Du, Y. (2011). β -1,3-Glucan with different degree of polymerization induced different defense responses in tobacco. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), pp.774-782.
- Gao, Q., Kachroo, A. and Kachroo, P. (2014). Chemical inducers of systemic immunity in plants. *Journal of Experimental Botany*, 65(7), pp.1849-1855.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F. and Grimont, P. (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2), pp.469-478.
- Gimenez-Ibanez, S., Boter, M., Ortigosa, A., García-Casado, G., Chini, A., Lewsey, M., Ecker, J., Ntoukakis, V. and Solano, R. (2016). JAZ2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytologist*, 213(3), pp.1378-1392.
- Hijaz, F., Nehela, Y. and Killiny, N. (2016). Possible role of plant volatiles in tolerance against huanglongbing in citrus. *Plant Signaling Behavior*, 11(3), p.e1138193.
- Hirano, S. and Upper, C. (2000). Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*: a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), pp.624-653.
- Hossain, M., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y., Mori, I. and Murata, Y. (2011). Involvement of Endogenous Abscisic Acid in Methyl Jasmonate-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156(1), pp.430-438.
- Huang, D., Wu, W., Abrams, S. and Cutler, A. (2008). The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), pp.2991-3007.
- Huang, J., Cardoza, Y., Schmelz, E., Raina, R., Engelberth, J. and Tumlinson, J. (2003). Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta*, 217(5), pp.767-775.
- Huang, J., Schmelz, E., Alborn, H., Engelberth, J. and Tumlinson, J. (2005). Phytohormones Mediate Volatile Emissions During The Interaction Of Compatible and Incompatible Pathogens: The Role Of Ethylene In *Pseudomonas syringae* Infected Tobacco. *Journal of Chemical Ecology*, 31(3), pp.439-459.
- Hückelhoven, R. (2007). Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), pp.101-127.
- Ishiga, Y., Ishiga, T., Uppalapati, S. and Mysore, K. (2013). Jasmonate ZIM-Domain (JAZ) Protein Regulates Host and Nonhost Pathogen-Induced Cell Death in Tomato and *Nicotiana benthamiana*. *PLOS ONE*, 8(9), p.e75728.
- Jones, J. and Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), pp.323-329.
- Kabbas, E. (2015). Estudio del papel de los compuestos volátiles de tomate en la defensa frente a una infección bacteriana. Trabajo Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia
- Kachroo, A. and Robin, G. (2013). Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4), pp.527-533.
- Lanahan, M., Yen, H., Giovannoni, J. and Klee, H. (1994). The Never Ripe Mutation Blocks Ethylene Perception in Tomato. *THE PLANT CELL ONLINE*, 6(4), pp.521-530.

-
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B., Wingerd, B., Wang, J., Whalon, M., Pichersky, E. and Howe, G. (2004). The Tomato Homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. *THE PLANT CELL ONLINE*, 16(1), pp.126-143.
- Lisón P, López-Gresa MP, Rodrigo I and Bellés JM. (2017). HB as a new crop shield. (P201730685).
- Lison, P., Rodrigo, I. and Conejero, V. (2006). A Novel Function for the Cathepsin D Inhibitor in Tomato. *Plant Physiology*, 142(3), pp.1329-1339.
- López Gresa, M., Lisón, P., Campos, L., Rodrigo, I., Rambla, J., Granell, A., Conejero, V. and Bellés, J. (2017). A non-targeted metabolomics approach unravels the VOC network underlying the tomato immune response against bacteria. *Scientific Reports* (en revisión).
- Matsui, K., Minami, A., Hornung, E., Shibata, H., Kishimoto, K., Ahnert, V., Kindl, H., Kajiwara, T. and Feussner, I. (2006). Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry*, 67(7), pp.649-657.
- Melotto, M., Underwood, W. and He, S. (2008). Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), pp.101-122.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. and He, S. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell*, 126(5), pp.969-980.
- Muñoz-Espinoza, V., López-Climent, M., Casaretto, J. and Gómez-Cadenas, A. (2015). Water Stress Responses of Tomato Mutants Impaired in Hormone Biosynthesis Reveal Abscisic Acid, Jasmonic Acid and Salicylic Acid Interactions. *Frontiers in Plant Science*, [online] 6. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00997>.
- Niinemets, Ü., Kännaste, A. and Copolovici, L. (2013). Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Ozáez, M. (2017). Papel defensivo de los compuestos volátiles de hoja verde en plantas de tomate frente a una infección bacteriana. Trabajo Fin de Máster. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas.
- Park, S., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, D. (2007). Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science*, 318(5847), pp.113-116.
- Pauwels, L. and Goossens, A. (2011). The JAZ Proteins: A Crucial Interface in the Jasmonate Signaling Cascade. *THE PLANT CELL ONLINE*, 23(9), pp.3089-3100.
- Pichersky, E., Noel, J. and Duradeva, N. (2006). Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Science*, 311(5762), pp.808-811.
- Pieterse, C., Van Wees, S., Van Pelt, J., Knoester M., M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. and Van Loon, L. (1998). A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE*, 10(9), pp.1571-1580.
- Prost, I., Dhondt, S. and Rothe, G. (2005). Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens. *Plant Physiology*, 139(4), pp.1902-1913.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. and Jones, J. (2011). Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just Jasmonate-Salicylate Antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), pp.317-343.
- Ronald, P., Salmeron, J., Carland, F. and Staskawicz, B. (1992). The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *Journal of Bacteriology*, 174(5), pp.1604-1611.
- Scala, A., Mirabella, R., Mugo, C., Matsui, K., Haring, M. and Schuurink, R. (2013). (*E*)-2-hexenal promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* by activating jasmonic acid pathways in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Siegrist, J., Orober, M. and Buchenauer, H. (2000). β -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56(3), pp.95-106.
- Song, G. and Ryu, C. (2013). Two Volatile Organic Compounds Trigger Plant Self-Defense against a Bacterial Pathogen and a Sucking Insect in Cucumber under Open Field Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), pp.9803-9819.
-

- Spinelli, F., Noferini, M., Vanneste, J. and Costa, G. (2010). Potential of the electronic-nose for the diagnosis of bacterial and fungal diseases in fruit trees. *EPPO Bulletin*, 40(1), pp.59-67.
- Toome, M., Randjäv, P., Copolovici, L., Niinemets, Ü., Heinsoo, K., Luik, A. and Noe, S. (2010). Leaf rust induced volatile organic compounds signalling in willow during the infection. *Planta*, 232(1), pp.235-243.
- Truman, W., Bennett, M., Kubigsteltig, I., Turnbull, C. and Grant, M. (2007). *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), pp.1075-1080.
- ul Hassan, M., Zainal, Z. and Ismail, I. (2015). Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, 13(6), pp.727-739.
- Whalen, M., Innes, R., Bent, A. and Staskawicz, B. (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* Pathogens of *Arabidopsis* and a Bacterial Locus Determining Avirulence on Both *Arabidopsis* and Soybean. *THE PLANT CELL ONLINE*, 3(1), pp.49-59.
- Wiesel, L., Newton, A., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E., Birch, P. and Hein, I. (2014). Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Xin, X. and He, S. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), pp.473-498.
- Yamaguchi, Y., and Huffaker, A. (2011). Endogenous peptide elicitors in higher plants. Current Opinon. *Plant Biology* 14, pp.351-357.
- Yi, H., Heil, M., Adame-Alvarez, R., Ballhorn, D. and Ryu, C. (2009). Airborne Induction and Priming of Plant Defenses against a Bacterial Pathogen. *Plant Physiology*, 151(4), pp.2152-2161.
- Zhang, L., Zhang, F., Melotto, M., Yao, J. and He, S. (2017). Jasmonate signaling and manipulation by pathogens and insects. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), pp.1371-1385.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E., Jones, J., Felix, G. and Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428(6984), pp.764-767.

