

Trabajo de Fin de Máster

Máster Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Papel defensivo de los compuestos volátiles en *Arabidopsis thaliana*

Autora: Paula Galarza Jiménez

Tutores: Dr. Francisco José Vera Sirera y Dr. Ismael Rodrigo Bravo

Modalidad de TFM Experimental

Curso 2020-2021

Resumen

En respuesta a señales de estrés, las plantas sintetizan proteínas de defensa y compuestos químicos de diversa naturaleza, como los compuestos orgánicos volátiles (VOCs). En el laboratorio se observó que tras la infección de plantas de tomate con la bacteria patogénica *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), se promovía la emisión diferencial de los compuestos volátiles butanoato de (*Z*)-3-hexenilo (HB) y α -terpineol. Estos dos compuestos participan en la respuesta defensiva de la planta, ya que en plantas de tomate promovían el cierre estomático y reducían el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000. Además, el HB resultaba eficaz como compuesto que inducía el cierre estomático en otras especies de plantas.

En el presente TFM se estudia el volatiloma de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipos Columbia-0 (Col-0) y Landsberg erecta (*Ler*) tras su infección por *Pst* DC3000 mediante análisis GC-MS/MS. Además, se profundiza en el mecanismo de cierre estomático mediado por HB y α -terpineol en *Arabidopsis thaliana* mediante la puesta a punto de un protocolo de pérdida de peso y estudios de expresión génica.

Mientras que el HB no parece inducir el cierre estomático en *A. thaliana*, el α -terpineol sí lo hace, y además confiere resistencia a la infección por *Pst* DC3000.

Abstract

In response to stress, plants synthesize different defense proteins and chemical compounds, as volatile organic compounds (VOCs). In our laboratory, it has been identified the differential emission the volatile compounds (*Z*)-3-hexenyl butanoate (HB) and α -terpineol after infection of tomato plants with the pathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000 (*Pst* DC3000). Both compounds are involved in the defensive response of the plant by promoting the stomatal closure and reducing the bacterial growth of *Pst* DC3000 in tomato plants. Moreover, HB induced the stomatal closure in other plant species.

This TFM has focused on the study of the volatilome of *Arabidopsis thaliana* plants ecotypes Columbia-0 (Col-0) and Landsberg erecta (*Ler*) after its infection with *Pst* DC3000 using GC-MS/MS analysis. Furthermore, it delves into the stomatal closure mechanism mediated by HB and α -terpineol in *Arabidopsis thaliana* using the development of a weight loss protocol and genic expression studies.

While HB doesn't seem to induce the stomatal closure in *A. thaliana*, α -terpineol does it, and it also confers resistance to infection of *Pst* DC3000.

Abreviaturas

ABA: ácido abscísico

AAT: alcohol aciltransferasa

ADH: alcohol deshidrogenasa

ADH: hidropéroxido liasa

AOX: aleno óxido sintasa

Avr: factores de avirulencia

Col-0: Columbia-0

DMAPP: dimetilalil pirofosfato

EF-Tu: factor de elongación Tu

ETS: susceptibilidad desencadenada por efectores (*Effector-Triggered Susceptibility*)

G3P: glicerol-3-fosfato

GLVs: volátiles de hoja verde

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

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

HR: respuesta de muerte celular hipersensible (*Hypersensitive cell death Response*)

HS-SPME: *Head Space Solid-Phase Micro-Extraction*

IPP: isopentil pirofosfato

LB: Luria Bertani

Ler: Landsberg erecta

LOX: lipooxigenasa

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MEP: metileritritol fosfato

MeSA: ácido metil salicílico

MEV: ácido mevalónico

MS: Murashige-Skoog

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

NCBI: Centro Nacional de Información de Biotecnología (*National Centre for Biotechnology Information*)

NIST: *National Institute of Standards and Technology*

NPR1: *nonexpresser PR genes-1*

OD: densidad óptica

ORF: pauta abierta de lectura (*Open Reading Frame*)

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*)

pb: par de bases

PLS: análisis de mínimos cuadrados parciales (*Partial Least Squares*)

PR: proteínas relacionadas con la patogénesis

PRRs: patrones de reconocimiento (*Pattern Recognition Receptors*)

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

PTI: inmunidad desencadenada por PAMPs (*PAMP-Triggered Immunity*)

PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa

R: genes específicos de resistencia a enfermedad

SA: ácido salicílico

SAR: resistencia sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*)

T_m: temperatura de fusión

TPS: terpeno sintasa

UFC: unidades formadoras de colonias

VOCs: compuestos orgánicos volátiles

ÍNDICE

ABREVIATURAS	- 5 -
1. INTRODUCCIÓN	- 9 -
1.1. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 como organismo patógeno.....	- 9 -
1.2. <i>Respuesta defensiva de la planta frente a patógenos</i>	- 10 -
1.2.1. Inmunidad activada por PAMPs (PTI)	- 12 -
1.2.2. Inmunidad activada por efectores (ETI).....	- 13 -
1.3. <i>Mecanismo de cierre estomático en plantas</i>	- 13 -
1.4. <i>Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y su acción en la respuesta defensiva de la planta</i> ...	- 14 -
1.4.1. Papel del butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB)	- 15 -
1.4.2. Papel del α -terpineol	- 17 -
2. OBJETIVOS.....	- 19 -
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 20 -
3.1. <i>Material vegetal</i>	- 20 -
3.1.1. Cultivo <i>in vitro</i> y tratamientos	- 20 -
3.1.2. Cultivo en tierra y tratamientos.....	- 21 -
3.2. <i>Material microbiológico y medios de cultivo</i>	- 22 -
3.3. <i>Infección bacteriana</i>	- 23 -
3.3.1. Preparación del inóculo bacteriano.....	- 23 -
3.3.2. Infección por pulverización.....	- 23 -
3.3.3. Conteo bacteriano	- 23 -
3.4. <i>Análisis de compuestos volátiles por GC-MS/MS</i>	- 24 -
3.5. <i>Extracción de RNA y preparación de cDNA</i>	- 25 -
3.6. <i>Amplificación por qRT-PCR</i>	- 25 -
3.7. <i>Pérdida de peso</i>	- 27 -
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 28 -
4.1. <i>Análisis de compuestos volátiles</i>	- 28 -
4.2. <i>Expresión de genes en respuesta a la infección</i>	- 32 -
4.2.1. Infección de <i>A. thaliana</i> con <i>Pst</i> DC3000.....	- 32 -
4.3. <i>Pérdida de peso</i>	- 34 -
4.3.1. Tomate como control positivo de cierre estomático con tratamiento de volátiles: HB y α -terpineol	- 34 -
4.3.2. <i>A. thaliana</i> tratada con volátiles (HB y α -terpineol).....	- 35 -
4.4. <i>Efecto del HB y el α-terpineol sobre dianas moleculares del cierre estomático en Arabidopsis thaliana</i>	- 38 -
5. CONCLUSIONES	- 41 -
6. BIBLIOGRAFÍA.....	- 42 -
7. ANEXOS	- 46 -

1. Introducción

1.1. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 como organismo patógeno

Pseudomonas syringae (*Ps*) es una bacteria aerobia Gram negativa, que aproximadamente mide 1,5 μm de longitud y entre 0,7 y 1,2 μm de diámetro. Esta bacteria presenta motilidad usando, al menos, un flagelo polar. La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 22-30°C [1].

Es un patógeno hemibiotrofo de infección local que ataca principalmente partes aéreas como hojas y frutos. La infección a menudo se restringe a unos pocos milímetros del sitio inicial de infección y no se dispersa a otras partes de la planta. En un ciclo de infección exitoso, *Ps* generalmente pasa por dos fases de vida que están espacial y temporalmente interconectadas: una fase inicial epifítica a la llegada de la superficie de la planta sana, y una fase endofítica en el espacio apoplástico de la planta, después de haber entrado por estomas o heridas en la superficie de la planta [3, 4].

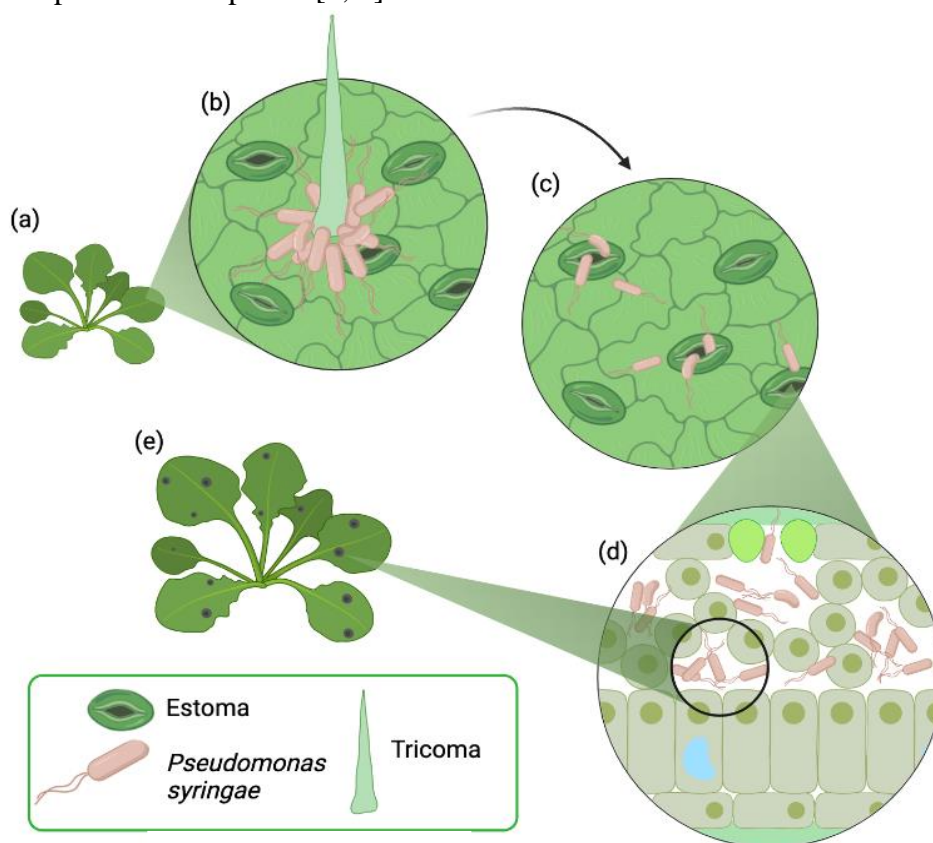


Figura 1. Ciclo infeccioso de *Pseudomonas syringae*. (a) Hojas sanas de *Arabidopsis*. (b) Agregación bacteriana cerca de tricomas en la superficie foliar. (c) Bacterias penetrando dentro de la planta por estomas abiertos. (d) Sección transversal de la hoja, bacterias multiplicándose de forma extensiva en el apoplasto. (e) Enfermedad visible: necrosis y clorosis foliar. Realizado con Biorender (www.biorender.com).

Bajo condiciones ambientales favorables que promueven la apertura estomática de la planta, como pueden ser lluvia fuerte, elevada humedad o temperatura moderada, *Ps* puede multiplicarse agresivamente en la planta huésped. La fase de multiplicación más virulenta ocurre en ausencia de muerte celular programada. En los estadios más tardíos de la patogénesis, las células huésped de la planta mueren y los tejidos infectados presentan necrosis extendida (**Figura 1**). Este modo de patogénesis se diferencia de aquellos estrictamente biotrofos en que no obtienen los nutrientes de las células huésped vivas causando así la muerte celular; y de los estrictamente necrotrofos en que no matan a las células huésped en los estadios tempranos de infección [2].

En función de la planta a la que infecte, la especie de *Pseudomonas syringae* se divide en unos 60 patovares a día de hoy [4]. El patovar de *Ps* en el que nos centramos en este trabajo es *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (*Pst*) DC3000, una bacteria resistente a rifampicina derivada de *Pst* DC52 y generada por el Dr. Cuppels [5]. Años más tarde se descubrió que *Pst* DC3000, además de infectar tomate podía infectar a *Arabidopsis* [6]. A diferencia de otros patovares, *Pst* DC3000 tiene una fase epifítica muy débil: si no ha conseguido penetrar en la planta en menos de 48 horas de estar en la superficie del tejido, muere. En cambio, una vez dentro de la planta, es un patógeno muy agresivo [7].

Pst DC3000 presenta un cromosoma circular y dos plásmidos, con un total de 5763 pautas de lectura abiertas que se clasifican en categorías funcionales, el 5% de las cuales están relacionadas con la virulencia: toxinas, hormonas, flagelo, factores de anclaje a superficies o sistemas especializados de secreción de proteínas [2].

1.2. Respuesta defensiva de la planta frente a patógenos

El sistema inmunitario de la planta presenta varios niveles [8]. Por una parte, existen receptores transmembrana con patrones de reconocimiento (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*) que responden a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) de evolución lenta, como la flagelina (en concreto, interaccionan con un dominio conservado en su extremo amino terminal) [9]. La interacción PAMP/PRR provoca acciones dentro de la célula, usando los motivos proteicos polimórficos NB-LRR (*Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat*) codificados por muchos genes específicos de resistencia a enfermedad (*R*) de la planta. Los patógenos liberan moléculas efectoras (*Avr*, factores de avirulencia) [10], las cuales son reconocidas por las proteínas codificadas por los

genes *R* de la planta, y se activan respuestas específicas de defensa. La resistencia a enfermedad mediada por NB-LRR es efectiva frente a patógenos hemibiotrofos o biotrofos (que pueden crecer solo en el tejido huésped), pero no frente a patógenos necrotrofos (que matan el tejido huésped durante la colonización).

Este sistema inmunitario se puede, por tanto, esquematizar con el llamado modelo en zig-zag [10] (**Figura 2**):

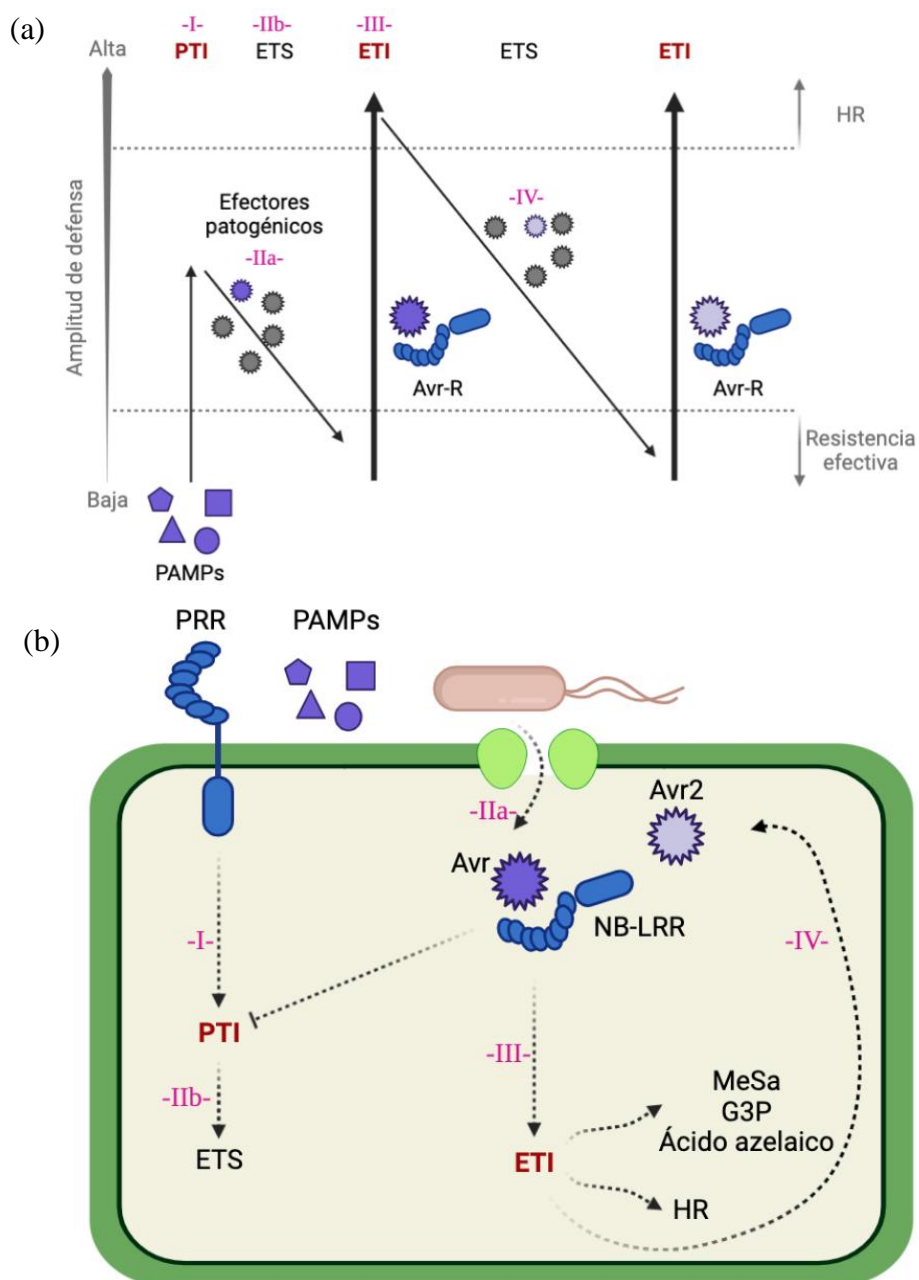


Figura 2. Sistema inmunitario de la planta representado con el modelo en zig-zag (a) Modelo en zig-zag de respuesta inmune. La amplitud de la resistencia o susceptibilidad a enfermedad es proporcional a $[PTI - ETS + ETI]$. Figura adaptada de [10]. (b) Ruta del modelo en zig-zag de respuesta inmune en la célula vegetal. Figura adaptada de [8].

Realizadas con Biorender (www.biorender.com).

En una primera fase, los PAMPs son reconocidos por PRRs (**Figura 2 -I-**), dando lugar a la inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI, *PAMP-Triggered Immunity*) que puede frenar la futura colonización de la planta por los patógenos.

En una segunda fase, los patógenos que han conseguido entrar en la planta liberan Avr que contribuyen a su virulencia (**Figura 2 -IIa-**). Los Avr pueden interferir con la PTI, resultando en la susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS, *Effector-Triggered Susceptibility*) (**Figura 2 -IIb-**).

En una tercera fase, un efector dado es reconocido específicamente por una de las proteínas NB-LRR, dando lugar a la inmunidad desencadenada por efectores (ETI, *Effector-Triggered Immunity*) (**Figura 2 -III-**). El reconocimiento puede ser indirecto (teoría de guarda), o a través del reconocimiento directo de un efector por NB-LRR. ETI es una respuesta PTI acelerada y amplificada, que resulta en la resistencia a enfermedad y en una respuesta de muerte celular hipersensible (HR, *Hypersensitive cell death Response*) en el sitio de infección y puede retrasar e incluso detener el crecimiento del patógeno en algunas interacciones.

En una cuarta fase, ambas partes del sistema (patógeno y planta) son susceptibles a la selección natural y, por parte del patógeno, se empieza a diversificar el gen efector reconocido para evitar ETI (**Figura 2 -IV-**); por parte de la planta, se seleccionan nuevas especificidades de genes *R* para que la ETI se pueda desencadenar frente a nuevos Avr.

Uno de los primeros eventos de señalización tanto en PTI como en ETI son las cascadas de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) [11]. A través de la fosforilación de proteínas diana las MAPKs controlan la síntesis y/o señalización de hormonas de defensa, la activación de genes de defensa, la síntesis de metabolitos antimicrobianos, el cierre estomático y la muerte celular por HR. Los patógenos, por su parte, usan los Avr para inactivar las cascadas MAPK directa o indirectamente (a través de componentes de señalización aguas arriba en la ruta MAPK). Por otra parte, las fosfatasas de las plantas pueden desfosforilar e inactivar las MAPKs, regulando así la magnitud, duración y el resultado de la infección.

1.2.1. Inmunidad activada por PAMPs (PTI)

En *Ps* existen dos PAMPs que desencadenan PTI muy representativas: la flagelina bacteriana y el factor de elongación Tu (EF-Tu). Ambos son reconocidos en *A. thaliana*. El primero es reconocido por el receptor LRR tipo kinasa llamado FLS2, y el segundo por el

llamado EFR. Las respuestas a estos diferentes PAMPs convergen en un número limitado de rutas de señalización y llevan a un conjunto común de productos que constituyen la PTI [10].

1.2.2. Inmunidad activada por efectores (ETI)

Las bacterias patógenas de plantas liberan entre 15-30 efectores por cepa en las células huésped usando sistemas de secreción de tipo III (TTSS, *type III secretion systems*). Algunos efectores tienen funciones estructurales, otros promueven la dispersión de patógenos o el escape de nutrientes y muchos contribuyen a la supresión de uno o varios componentes de PTI o de ETI. Contribuyen a la virulencia del patógeno muchas veces mimetizando o inhibiendo funciones celulares eucarióticas. Pueden mimetizar, por ejemplo, hormonas vegetales. Algunas cepas de *Pst* producen coronatina, un compuesto mimético del ácido jasmónico que suprime la defensa mediada por ácido salicílico en patógenos biotrofos e induce la apertura estomática, ayudando a la bacteria patogénica a entrar en el apoplasto [10].

ETI puede inducir la producción de señales de inmunidad móviles en las plantas como el ácido metil salicílico (MeSA), el ácido azelaico y el glicerol-3-fosfato (G3P) que son transportadas sistémicamente del sitio de infección a tejidos no infectados. La acumulación de estas sustancias en tejidos no infectados induce la producción de ácido salicílico (SA) y media una programación transcripcional masiva. A este mecanismo se le denomina resistencia sistémica adquirida (SAR, *Systemic Acquired Resistance*). Finalmente, este proceso lleva a la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) que tienen actividad antimicrobiana y protegen a la planta de posteriores ataques patogénicos. En *Arabidopsis*, la proteína NPR1 (*nonexpresser PR genes-1*) sirve como receptor del SA y actúa como un coactivador transcripcional [8].

1.3. Mecanismo de cierre estomático en plantas

Los estomas regulan el intercambio de gases entre la planta y el ambiente, y controlan la pérdida de agua regulando el tamaño del poro que se forma entre las dos células guarda que lo componen. Este control depende factores ambientales como la humedad relativa, la concentración de CO₂ y la intensidad de luz. El ácido abscísico (ABA) es uno de los componentes principales del cierre estomático mediado por estrés hídrico, y tras ella hay una compleja red de transducción de la señalización en las células guarda de los estomas [3], que finaliza regulando canales de iones en las células guarda. Esto modifica, a su vez, el flujo de

agua, y cambia la turgencia de las células guarda, abriendo o cerrando los poros de los estomas [12]. En la ruta de cierre estomático por ABA, *MYB44* mejora su señalización y por tanto, promueve el cierre estomático [13]. En cambio, *MYB60* tiene un patrón de expresión en las células guarda que se reduce en respuesta a estrés hídrico, promoviendo el cierre estomático [14].

En el proceso de infección de *Pst* DC3000, la coronatina juega un papel muy importante a varios niveles [2]. Los estomas son una de las partes de la planta más utilizadas por las bacterias para entrar en la hoja. Pese a que su apertura y cierre está controlado por factores diversos como condiciones ambientales y PAMPs, los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la percepción de coronatina no abren los estomas eficientemente y *Pst* DC3000 no causa apenas infección en la planta, lo que indica que la coronatina facilita la invasión bacteriana a través de los estomas. La coronatina también promueve la multiplicación de *Pst* DC3000 dentro del apoplasto, media los síntomas de la enfermedad (clorosis principalmente) e induce la susceptibilidad de la enfermedad en tejidos sistémicos de la planta.

Además, se ha estudiado la implicación de factores ambientales, como la humedad relativa y la intensidad de la luz, combinados con la infección con *Pst* DC3000. Una humedad relativa elevada compromete la defensa mediada por estomas, pero a su vez va acompañada de la regulación de las rutas del ácido salicílico y jasmónico en las células guarda. Por su parte, los estomas están cerrados en los periodos de oscuridad y por tanto la entrada de patógenos se ve comprometida, pero, al combinarse con la coronatina producida por *Pst* DC3000 los estomas se abren [15].

1.4. Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y su acción en la respuesta defensiva de la planta

Los compuestos orgánicos volátiles son moléculas lipofílicas de bajo peso molecular y alta presión de vapor a temperatura ambiente. Sus propiedades físicas les permiten moverse libremente a través de las membranas celulares [16].

La biosíntesis de muchos VOCs se origina a partir de 4 rutas que parten del metabolismo primario de la planta (**Figura 3**). La ruta que se emplea depende de la especie, el ambiente y el estado de desarrollo de la planta [17]. Estas rutas son: la ruta del shikimato, del metileritritol fosfato (MEP), del ácido mevalónico (MEV) y de la lipooxigenasa (LOX). Cada una de ellas produce VOCs como los fenilpropanoides y bencenoides; hemiterpenos, monoterpenos,

diterpenos y derivados volátiles de carotenoides; sesquiterpenos; y volátiles de hoja verde (GLVs) y metil jasmonato, respectivamente.

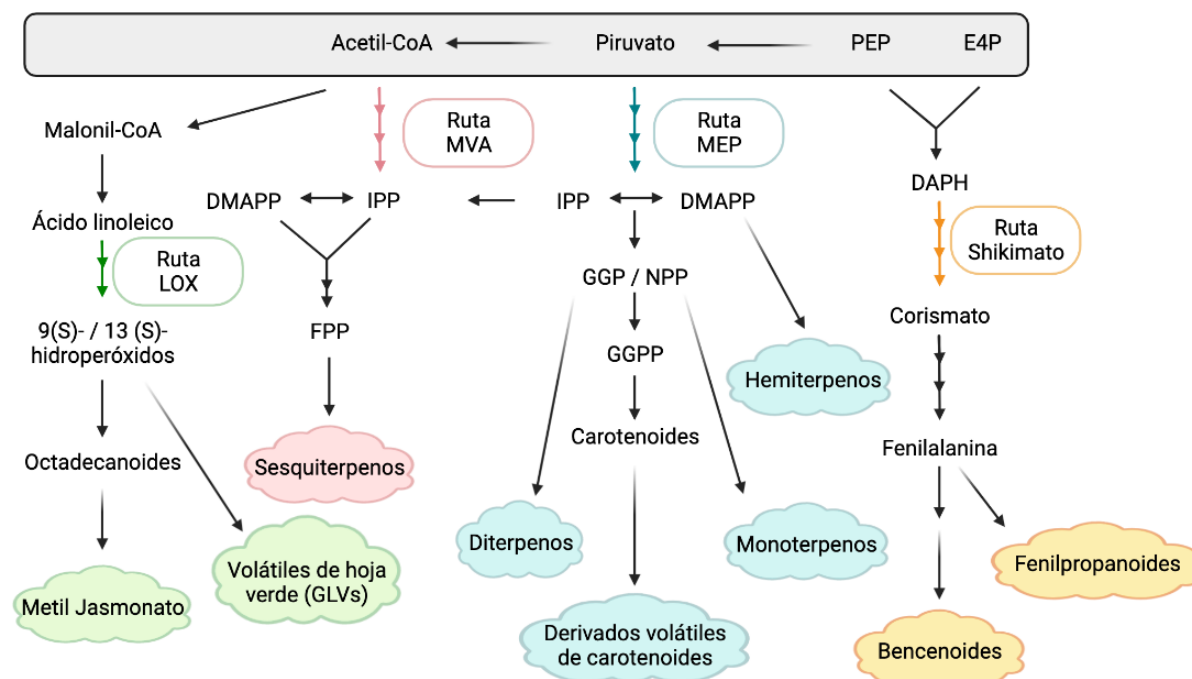


Figura 3. Rutas biosintéticas de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de plantas. Los precursores de los VOCs se originan del metabolismo primario (caja gris). Las cuatro rutas principales son la ruta del shikimato, del metileritritol fosfato (MEP), del ácido mevalónico (MEV) y de la lipooxigenasa (LOX), que conducen a la producción de diferentes VOCs.

Varias flechas seguidas indican múltiples reacciones enzimáticas involucradas. Abreviaturas: DAHP, 3.desoxi-D-arabinoehptulose-7-fosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; E4P, eritrosa 4-fosfato; FPP, farnesil pirofosfato; GGPP, geranilgeranil pirofosfato; GPP, geranil pirofosfato; IPP, isopentil pirofosfato; NPP, neril pirofosfato; PEP, fosfoenolpiruvato. Figura adaptada de [16], realizado con Biorender (www.biorender.com).

Los VOCs presentan funciones muy variadas en plantas: atracción de polinizadores, defensa contra herbívoros y patógenos, señalización inter-planta y protección frente a diferentes estreses abióticos [16].

1.4.1. Papel del butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB)

Como se ha comentado, una de las rutas implicadas en la producción de VOCs es la ruta de las lipooxigenasas (LOX) (**Figura 4**). Esta es una de las más importantes puesto que en ella se activan genes relacionados con la defensa de la planta que inducen la síntesis de metabolitos secundarios útiles frente a patógenos: las fitoaxilipinas. Se trata de lípidos bioactivos que derivan de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), principalmente ácido

linoleico y ácido α -linoleico. Esta clase está principalmente representada por jasmonatos y volátiles de hoja verde (GLVs) [17].

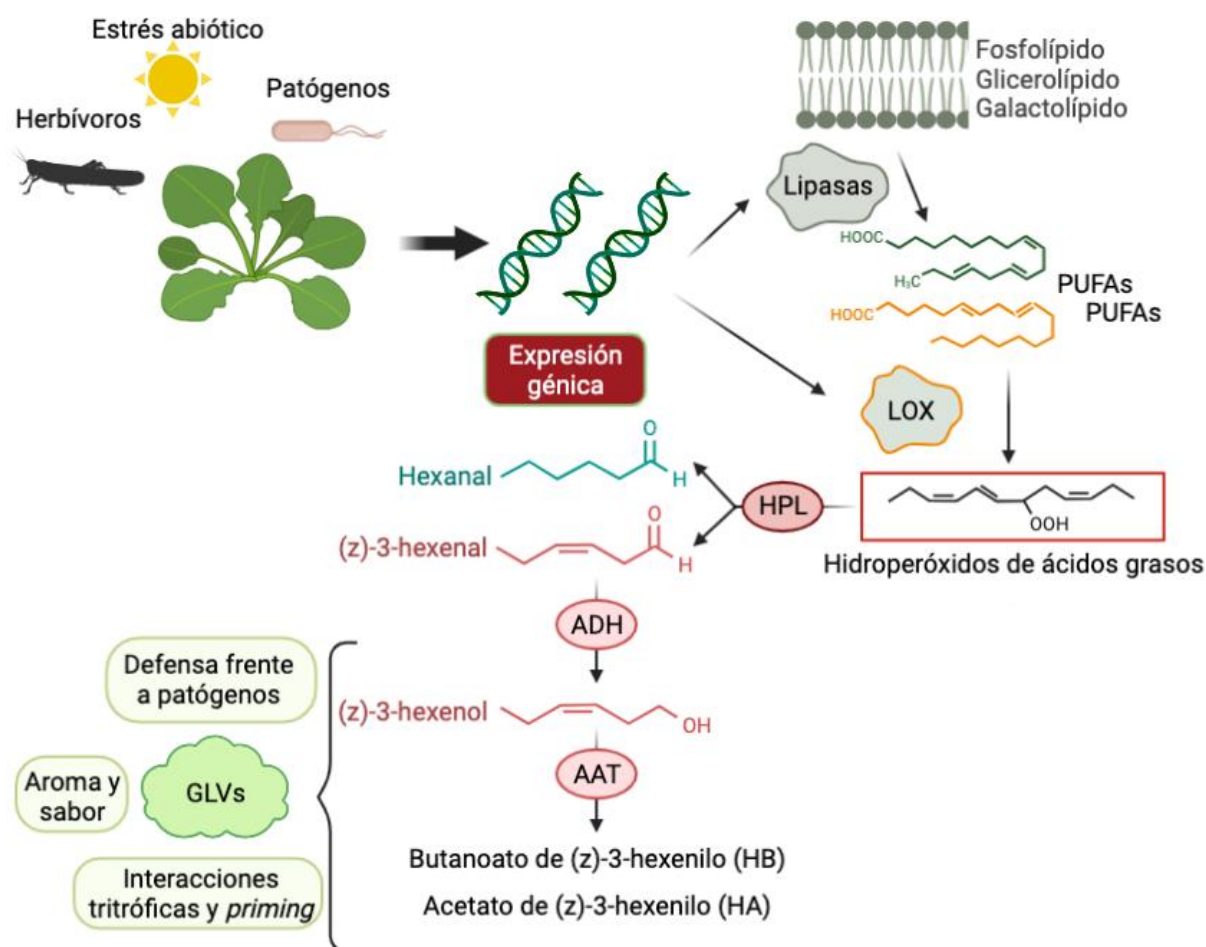


Figura 4. Biosíntesis de GLVs: ruta de las oxilipinas. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) entran en la ruta de las lipooxigenasas (LOXs) dando lugar a sus hidroperóxidos correspondientes. Estos se convierten en hexanal y (Z)-3-hexenal por acción de la hidroperóxido liasa (HPL), los cuales se convierten en sus respectivos alcoholes por la alcohol deshidrogenasa (ADH) y se esterifican mediante la alcohol aciltransferasa (AAT), dando así lugar a la formación de GLVs. Figura adaptada de [17], realizado con Biorender (www.biorender.com).

Puesto que en este trabajo nos centramos en el HB, resultan de especial interés los GLVs. Las plantas emiten cantidades traza de GLVs bajo condiciones fisiológicas normales, en cambio, bajo condiciones de estrés éstos se forman muy rápidamente.

Los GLVs están compuestos por aldehídos C6 y C9, sus alcoholes y sus ésteres. En la ruta de su biosíntesis tienen un papel importante las lipooxigenasas, que están clasificadas en dos tipos: las 9-LOX, localizadas fuera de los plástidos, y las 13-LOX, que contienen un péptido de tránsito a plástidos [17]. Su clasificación ilustra en qué posición del esqueleto hidrocarbonado de los PUFAs realizan la oxigenación, en el C9 o el C13 [18]. Mientras que

los productos de la ruta de las 9-LOX tienen implicaciones importantes en la HR; los de las 13-LOX son componentes importantes en la regulación de la expresión génica de la defensa de la planta [17].

Otras enzimas de interés en esta ruta son las hidropéroxido liasas (HPLs). Muchas de ellas están ancladas en la membrana y, en concreto en *A. thaliana*, contienen un péptido de tránsito al cloroplasto. Dependiendo de la especificidad del sustrato hay tres tipos de enzimas: 9-HPL, 13-HPL y 9/13-HPL, que catalizan la isomerización de 9- y 13-hidropéroxidos de PUFAs, respectivamente, a hemiacetales inestables. En el caso de la ruta de las 13-HPL los hemiacetales inestables se descomponen espontáneamente en los aldehídos C6 volátiles hexanal y (Z)-3-hexenal, que derivan del ácido linoleico y el ácido α -linoleico, respectivamente [17]. Finalmente, las alcohol aciltransferasas (AATs) catalizan las diferentes esterificaciones de los alcoholes, formando, por ejemplo, el butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) o el acetato de (Z)-3-hexenilo (HA).

En nuestro laboratorio se observó que la activación de ETI en las plantas de tomate promovía la emisión diferencial de ésteres del (Z)-3-hexenol [19]. También se estuvo estudiando la implicación de estos ésteres en el cierre estomático como posible estrategia defensiva de las plantas [20], concluyendo que los tratamientos con HB producían un cierre estomático significativo y, además, reducían el crecimiento bacteriano de *Pst* DC3000 en las plantas de tomate. Por su parte, el HA fue el único éster que parecía tener un papel directo en la defensa antibacteriana, pese a no tener ningún efecto sobre el cierre estomático. Además, el HB también resultaba eficaz como compuesto que inducía el cierre estomático en otras especies de plantas [20]. Dada la gran cantidad de posibles usos que tiene en agricultura, este compuesto ha sido patentado y licenciado [21].

Por la importancia de este compuesto, este trabajo se centrará en profundizar en el estudio del mecanismo de cierre estomático mediado por HB en *A. thaliana*, como organismo modelo [22].

1.4.2. Papel del α -terpineol

Otra de las rutas implicadas en la formación de VOCs, como ya se ha comentado, es la de metireritritol fosfato (MEP), que finaliza con la formación de monoterpenos, diterpenos, hemiterpenos y derivados volátiles de carotenoides [16] (**Figura 3**). Los terpenos representan el grupo más grande y diverso de metabolitos secundarios en plantas. Entre sus funciones

destacan la defensa contra patógenos, herbívoros, inductores de defensa en plantas vecinas y atractivos de polinizadores [23]. La ruta MEP es exclusivamente plastídica y comienza con 7 pasos enzimáticos hasta la formación del intermediario MEP. A partir de ahí se necesitan 5 pasos más para convertir el MEP en isopentil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP), los cuales se convierten en prenil difosfatos. El último paso para la formación de la gran variedad de terpenos se produce por la acción de las terpeno sintasas (TPSs), una familia de más de 100 miembros [23]. En *A. thaliana*, las terpeno sintasas TS23/27 son las encargadas de sintetizar el α -terpineol [24].

En nuestro laboratorio se observó que la activación de ETI en las plantas de tomate promovía la emisión diferencial de monoterpenos hidroxilados como el α -terpineol [19]. También en nuestro laboratorio, se ha observado recientemente que este compuesto es capaz de promover el cierre estomático en plantas de tomate y que éste puede estar implicado en la respuesta defensiva de la planta (resultados pendientes de publicación).

Teniendo en cuenta estos resultados, en este trabajo se va a complementar el estudio antes mencionado con el HB investigando el papel del α -terpineol en el cierre estomático y la respuesta defensiva de *A. thaliana*.

2. Objetivos

Los compuestos orgánicos volátiles de plantas (VOCs) comprenden una amplia familia de metabolitos secundarios con funciones muy variadas, entre las que destacan la adaptación a situaciones de estrés biótico.

Empleando un sistema modelo basado en *Arabidopsis thaliana* como planta hospedadora y la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, este trabajo va a tener como objetivos el estudio del volatiloma de la planta tras su infección por la bacteria, así como el análisis de la acción de los compuestos volátiles HB y α -terpineol, que han sido descritos en nuestro laboratorio como potentes inductores del cierre estomático.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

Para la realización de este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) y Landsberg erecta (*Ler*) de la línea silvestre, además de plantas de *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker.

3.1.1. Cultivo *in vitro* y tratamientos

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se esterilizaron 3 minutos en alcohol 70 % con 0,05 % de Triton X-100 (*Sigma Chemical CO. P.O.*, St. Luis, MO, EEUU) en agitación, y se mantuvieron durante 1 minuto más en alcohol 96 % agitando suavemente. Las semillas se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel de filtro estéril y se sembraron entre 30 y 50 semillas sobre círculos de papel de filtro estéril (80 mm de diámetro) en 25 mL de medio Murashige Skoog (MS) (**Tabla 1**) en placas Petri de 90 mm de diámetro y 23 mm de altura (en lo sucesivo nombradas como placas Petri “dobles”). Las placas se sellaron con cinta Micropore de 2,5 cm de ancho (*3M*, St. Paul, MN, EEUU) y las semillas se vernalizaron 48 horas en oscuridad a temperatura de 4 °C. Posteriormente, las placas con las semillas se germinaron y crecieron en cámara de cultivo con humedad relativa del 50/60 %, 8 horas de luz a 23 °C y 16 horas de oscuridad a 19 °C. Las plantas se dejaron crecer 10 días, y el décimo día se transfirió el papel de filtro junto con las plántulas a una nueva placa Petri doble, también con medio base MS, suplementado con los tratamientos pertinentes (**Tabla 2**).

Tabla 1. Medios de cultivo de plantas utilizados en cultivo *in vitro* y su composición.

Ajustar pH con NaOH antes de añadir el fitoagar.

Medio	Composición	Cantidad (V _F = 1L)	pH
MS	Sacarosa (<i>AppliChem GmbH</i> , Darmstadt, Alemania)	10 g	5,7
	Murashige Skoog (<i>Duchefa Biochimie</i> , Haaarlem, Holanda)	2,35 g	
	Fitoagar (<i>Duchefa Biochimie</i> , Haaarlem, Holanda)	10 g	
	H ₂ O destilada	1 L	
MS Tomate	Sacarosa (<i>AppliChem GmbH</i> , Darmstadt, Alemania)	15 g	5,7
	Murashige Skoog (<i>Duchefa Biochimie</i> , Haaarlem, Holanda)	2,45 g	
	Fitoagar (<i>Duchefa Biochimie</i> , Haaarlem, Holanda)	4 g	
	H ₂ O destilada	1 L	

Los tratamientos con los compuestos volátiles se hicieron mediante un bastón de algodón impregnado con el compuesto, dispuesto en el interior de las placas Petri dobles cerradas con Parafilm, para minimizar la pérdida del compuesto volátil, durante 24 horas.

Tabla 2. Composición de los tratamientos realizados en cultivo in vitro.

Tratamiento	Compuesto	Concentración (μM)	Aplicación
HB	Butanoato de (Z)-3-hexenilo	250	Algodón
α -terpineol	α -terpineol	25	Algodón

Las semillas de *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker se esterilizaron en lejía al 30 % conteniendo un 0,05 % del detergente Tween20 durante 30 minutos, realizándose posteriormente lavados en agua destilada esterilizada de 5, 10 y 15 minutos. Las semillas esterilizadas se depositaron sobre papel de filtro esterilizado, dispuesto en una placa Petri doble con 5 mL de agua estéril. Las placas se sellaron con cinta Micropore y se dejaron en oscuridad y con humedad relativa del 50/60 %, alternando 8 horas a 23 °C y 16 horas a 19 °C, durante 3 días aproximadamente hasta su germinación. Se transfirieron entre 20-30 semillas germinadas sobre discos de papel de filtro estéril de 7 cm de diámetro en 25 mL de medio MS tomate (**Tabla 1**) en placa Petri doble. Las plantas se dejaron crecer durante 8 días, y posteriormente se transfirió el papel con las plántulas a una nueva placa Petri doble, también con medio base MS tomate, suplementado con los tratamientos pertinentes (**Tabla 2**).

3.1.2. Cultivo en tierra y tratamientos

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se vernalizaron en oscuridad a 4 °C en suspensión en solución de agarosa 0,1 % durante al menos 48 horas. Pasado este tiempo se sembraron con pipeta Pasteur, en bandejas de sustrato de siembra pre-humedecido con solución de Hoagland, y se sellaron las bandejas con film transparente. A los tres días se realizaron agujeros en el film que cubría las bandejas, y dos días más tarde éste se retiró.

Las plantas se cultivaron en cabinas de cultivo tipo fitotrón en condiciones de fotoperiodo de día corto (8 horas de luz a 21 °C; 16 horas de oscuridad a 19 °C) y humedad entre 50-60 %. A la semana de la siembra, se procedió a aclarar las bandejas con la ayuda de unas pinzas, retirando las plántulas sobrantes con tal de dejar dos plántulas por alveolo.

Para los tratamientos con HB, las plantas de *Arabidopsis thaliana* se pulverizaron por el envés de las hojas con HB preparado a 250 μM en agua suplementada con Silwet al 0,05 %,

usando agua con Silwet 0,05 % como control negativo, tras lo cual se introdujeron en cajas de metacrilato de 110 L de volumen.

Para el tratamiento con α -terpineol, las plantas se introdujeron en las cajas de metacrilato de 110 L dentro de las cuales se introdujeron algodones hidrofílicos impregnados con un volumen de α -terpineol de manera que se alcanzara una concentración de 5 μ M. Como control negativo se añadió el mismo volumen de agua a los algodones en las otras cajas.

Las plantas con ambos tratamientos se cultivaron en las condiciones del apartado 3.1.2 durante 24 horas.

3.2. Material microbiológico y medios de cultivo

La bacteria empleada para infectar las plantas fue *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000).

Los medios de cultivo empleados fueron Luria Bertani (LB) agar, King B agar y King B líquido (**Tabla 3**).

Tabla 3. Medios de cultivo de *Pseudomonas syringae*, su composición y aplicación en cada experimento.

Medio	Composición	Cantidad (V _F = 1L)	Antibiótico	Cantidad (V _F = 1L)	Aplicación
LB Agar	LB Agar (Lennox) (<i>Laboratorios Conda S.A.</i> , Madrid, España)	35 g	Kanamicina (100 mg/mL)	0,5 mL	Cultivo <i>Pst</i> DC3000
	H ₂ O destilada	1 L	Rifampicina (10 mg/mL)	10 mL	
			Espectinomicina (10 mg/mL)	2,5 mL	
King B Agar	King B Medium ISO (<i>Laboratorios Conda S.A.</i> , Madrid, España)	37 g	Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL	Conteo bacteriano <i>Pst</i> DC3000
	Glicerol	10 g			
	H ₂ O destilada	1 L			
King B líquido	Proteosa peptona N°3 (<i>Laboratorios Conda S.A.</i> , Madrid, España)	10 g	MgSO ₄ 1M	5 mL	Preparación inóculo infección <i>Pst</i> DC3000
	K ₂ HPO ₄	1,5 g	Estéril		
	Glicerol	15 g	Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL	
	H ₂ O destilada	1 L			

Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos antes de añadirles los antibióticos y el MgSO₄.

3.3. Infección bacteriana

3.3.1. Preparación del inóculo bacteriano

La bacteria se cultivó durante 48 horas a 28 °C en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio LB Agar. Se sembraron posteriormente cuatro colonias independientes, cada una en un tubo Falcon de 50 mL con 3 mL de medio King B líquido. Se dejaron crecer las células 24 horas a 28 °C en agitación. El contenido de cada tubo se dividió en tres tubos, cada uno con 1 mL del medio King B líquido con el cultivo bacteriano, y se llevó a un volumen final de 14 mL de King B líquido. Estos 12 tubos Falcon se cultivaron otras 24 horas a 28 °C. El contenido bacteriano se unificó en los 4 tubos Falcon originales y se centrifugó durante 15 minutos a 4 °C y 4000 rpm. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el sedimento en 50 mL de MgCl₂ 10 mM estéril mediante agitación manual suave. La absorbancia a 600 nm de la suspensión se fue midiendo con el espectrofotómetro y se ajustó a una densidad óptica (OD) de 0,2 con MgCl₂ 10 mM. Por último, a este inóculo se le añadió de detergente Silwet L-77 al 0,05 % como agente tensioactivo.

3.3.2. Infección por pulverización

El inóculo bacteriano preparado se suministró en forma de pulverizado por el envés de las hojas de roseta de las plantas de *Arabidopsis thaliana* de 6 semanas de crecimiento en fotoperiodo corto (apartado 3.1.2). Como control negativo se utilizó una solución de MgCl₂ 10 mM con Silwet L-77 al 0,05 %. Las plantas se cubrieron con papel film transparente y se mantuvieron en fitotrón en fotoperiodo de día largo (16 horas de luz a 21 °C; 8 horas de oscuridad a 19 °C) durante el tiempo deseado para cada experimento.

Para la infección combinada con α -terpineol, las plantas se pre-trataron durante 24 horas con α -terpineol y posteriormente se infectaron durante 48 horas.

3.3.3. Conteo bacteriano

Al día y dos días después de la infección se recolectaron 5 réplicas biológicas de 3 discos foliares de 1,1 cm de diámetro de cada ecotipo y condición. Cada réplica biológica se introdujo en 300 μ L de MgCl₂ 10 mM. Tras homogeneizar la muestra, se añadió MgCl₂ 10 mM hasta alcanzar volumen de 1 mL. Se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁵ y se sembraron 100 μ L

de las diluciones entre 10^{-3} y 10^{-5} (ambas incluidas) en medio King B Agar. Las placas se cultivaron a 37 °C durante 48 horas. Pasado este tiempo, se procedió a realizar el conteo de colonias de *Pst* DC3000 en aquella dilución que tuviera entre 20-200 unidades formadoras de colonias (UFC). Con un área de 2,85 cm² por cada 3 discos foliares, se calculó la media y desviación estándar del logaritmo de UFC/cm².

3.4. Análisis de compuestos volátiles por GC-MS/MS

En un vial de 10 mL de espacio de cabeza se pesaron 150 mg de pulverizado de hoja de *Arabidopsis thaliana* congelado. Se añadió 1 mL de una solución saturada de CaCl₂ y 100 µL de EDTA 750 mM, pH 7,5. Se agitó suavemente y se incubó en baño de ultrasonido durante 5 minutos. La extracción de los compuestos volátiles se realizó mediante HS-SPME (*Head Space Solid-Phase Micro-Extraction*) [25]. Los periodos de incubación y extracción fueron de 10 y 20 minutos respectivamente, ambos a una temperatura de 50 °C. La adsorción se realizó con fibras de DVB/PDMS de 65 µm. La desorción se realizó en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases durante 1 minuto a 250 °C sin fraccionamiento. La extracción e inyección de volátiles se realizó automáticamente con un *autosampler CombiPAL* [19].

La separación por cromatografía de los compuestos volátiles se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Santa Clara, CA, EEUU.) equipado con una *fused silica capillary column* (60 m de largo, diámetro interno 0,25 mm, espesor película 1 µm). Las condiciones de temperatura de la estufa fueron 40 °C durante 2 min, rampa de 5 °C/min hasta los 250 °C y mantenimiento isotérmico de 250 °C durante 5 min. Como gas portador se usó helio a 1,2 mL/min a flujo constante. Para la detección se utilizó un espectrómetro de masas Agilent 5975B (Santa Clara, CA, EEUU), operando en modo EI (energía de ionización, 70 eV; fuente de temperatura 230 °C). La adquisición de los datos se realizó en modo *scan* (rango *m/z* entre 25-250; 6 scans/s). Los cromatogramas y el espectro de masas se almacenaron y procesaron con el software Enhanced ChemStation (Agilent).

La identificación de los compuestos volátiles se realizó comparando tanto el espectro de masas como el tiempo de retención con los de los estándares puros, obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). La identificación se confirmó comparando sus espectros de masas con los de la librería de espectros de masas NIST 05 (*National Institute of Standards and Technology*). Los compuestos identificados se cuantificaron por el área del ion más

representativo y único (que no estuviera en compuestos con tiempos de retenciones similares) (Anexo 1).

Para comparar dos o más grupos de compuestos se llevó a cabo una prueba t de Student utilizando el paquete estadístico de Excel, considerando un *p-value* < 0,05 estadísticamente significativo.

3.5. Extracción de RNA y preparación de cDNA

La parte aérea de las plantas crecidas en tierra se recogió en nitrógeno líquido y se pulverizó manualmente con mortero. Se utilizaron 100 mg de este pulverizado congelado para realizar la extracción de RNA siguiendo el protocolo del kit comercial *NucleoSpin[®] RNA Plant* (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co., Düren, Alemania). La concentración de RNA obtenida se midió empleando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EEUU). Se tomó el volumen necesario de este RNA para tener 1 µg del mismo y así realizar la retrotranscripción a cDNA utilizando kit comercial *PrimeScript[™] RT Reagent Kit (Perfect Real Time)* (*Takara Bio Inc.*, Shiga, Japón). Se midió la concentración de cDNA de cada muestra y se llevó a un volumen adecuado para una concentración de 140 ng/µL de cDNA.

3.6. Amplificación por qRT-PCR

Las amplificaciones se realizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). Para ello se combinaron 0,5 µL de cDNA a concentración de 140 ng/µL, 6,3 µL de agua Mili-Q, 0,6 µL de cada cebador (con la secuencia directa y reversa del gen) a 5 µM y 2 µL del reactivo *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Waltham, MA, EEUU). El volumen final de reacción (10 µL) se aplicó a un pocillo de placas de 96 pocillos *MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate* (*Applied Biosystems*, Waltham, MA, EEUU). Las placas se sellaron cuidadosamente sin dejar burbujas de aire.

La amplificación se monitorizó a tiempo real usando el sistema de PCR en tiempo real 1500 Fast (*Life Technologies*, Waltham, MA, EEUU). Como control positivo del experimento, se utilizó en todos los casos el gen *Actina 8* (**Tabla 4**). Se realizaron 3 repeticiones técnicas de cada réplica biológica de cDNA y las secuencias de los oligonucleótidos empleados se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 4. Cebadores utilizados en las q-RT-PCRs. Los cebadores terminados con la letra “F” contienen la secuencia directa del gen, con la letra “R” contienen la secuencia reversa del gen.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Código AGI	Tm (°C)
PR1_qPCR_F	AGCTCTGTAGGTGCTCTTGTCTT	AT2G14610	64
PR1_qPCR_R	TGCCTGGTTGTGAACCCCTTAG		61
LEA14_qPCR_F	AGATTGAAAAGGGGAAGATACC	AT1G01470	58
LEA14_qPCR_R	GATTTGGAGCTCGTAGTCAATG		58
LOX1_qPCR_F	CAAATTTGGAGCAGTGAGTGAA	AT1G55020	58
LOX1_qPCR_R	AGTCATTACACCGACAAAAGC		58
LOX2_qPCR_F	GATTACGGTAGAAGACTACGCA	AT3G45140	58
LOX2_qPCR_R	CACATGTAAACGTTATCGACCC		58
MYB44_qPCR_F	AGAAACTGGACAGTGATTAGCA	AT5G67300	58
MYB44_qPCR_R	CCATTATTACCGAACTGAGCG		58
MYB60_qPCR_F	TGCGCTGCAAACCTTCTTCGACA	AT1G08810	62
MYB60_qPCR_R	TCCAACCCTCAAGAAGGCGGGA		66
HPL1_qPCR_F	CGAAGCTCAAAAGTATGGCTAC	AT4G15440	58
HPL1_qPCR_R	ATTGTTTTCCAACCGTTCTCAG		58
AT5G48540_qPCR_F	CACGAGAGACTTAAGCGAATTG	AT5G48540	58
AT5G48540_qPCR_R	AATTCTACCAACTAGGACCG		58
ACT8_qPCR_F	AGTGGTCGTACAACCGGTATT	AT1G49240	56
ACT8_qPCR_R	GAGGATAGCATGTGGAAGTGA		54

Los cebadores se diseñaron con el programa *qPrimerDB* (<https://biodb.swu.edu.cn/qprimerdb/>) y se comprobaron manualmente.

Para el diseño de todos los cebadores de este trabajo se establecieron como requisitos las siguientes condiciones recomendadas por los manuales: (1) tener una longitud de entre 15 y 30 pb; (2) tener un porcentaje de contenido de guaninas y citosinas de entre 40 y 60 %; (3) evitar la auto-hibridación, la hibridación con la pareja del cebador, la formación de estructuras secundarias internas y la dimerización (para ello, los extremos 3' de los cebadores no debían ser complementarios); (4) evitar 3 G o C seguidas cerca del extremo 3' (para evitar hibridaciones inespecíficas de cebadores); (5) tener la misma temperatura de fusión (Tm) los dos cebadores correspondientes a la misma pareja (y al ser posible, todos los cebadores).

3.7. Pérdida de peso

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas *in vitro* se trataron con HB y α -terpineol y se dejaron crecer durante 24 horas en las condiciones de cultivo *in vitro*. Cada placa contenía entre 30-50 plantas. Las partes aéreas y radiculares se pasaron a una tapa de placa Petri de 90 mm de diámetro previamente tarada y se anotó el peso cada minuto durante 90 minutos a temperatura ambiente. A las 24 horas de estas medidas, se volvió a pesar la placa con las plantas para estimar su peso seco.

Lo mismo se hizo para las plantas de tomate, con la diferencia de que cada placa contenía entre 15-25 plantas, se estuvo midiendo la pérdida de peso durante 3 horas, y la estimación del peso seco se realizó a las 48 horas.

4. Resultados y discusión

4.1. Análisis de compuestos volátiles

Para el realizar el análisis de los compuestos volátiles emitidos por *Arabidopsis thaliana* en respuesta a infección bacteriana, se inocularon plantas de los ecotipos Col-0 y *Ler* con *Pst* DC3000. Como comprobación previa del éxito de la infección se realizó un conteo de UFC (unidades formadoras de colonias) de *Pst* DC3000 en todas las muestras infectadas, a 1 y 2 días tras la infección (resultados no mostrados).

Con el análisis de compuestos volátiles mediante GC-MS/MS se identificaron diversos compuestos diferenciales dependiendo de si ha habido o no infección, y del ecotipo en cuestión.

Se realizan análisis mediante mínimos cuadrados parciales (*Partial Least Squares*, PLS) y se obtienen los *Scores plots* (Figura 5).

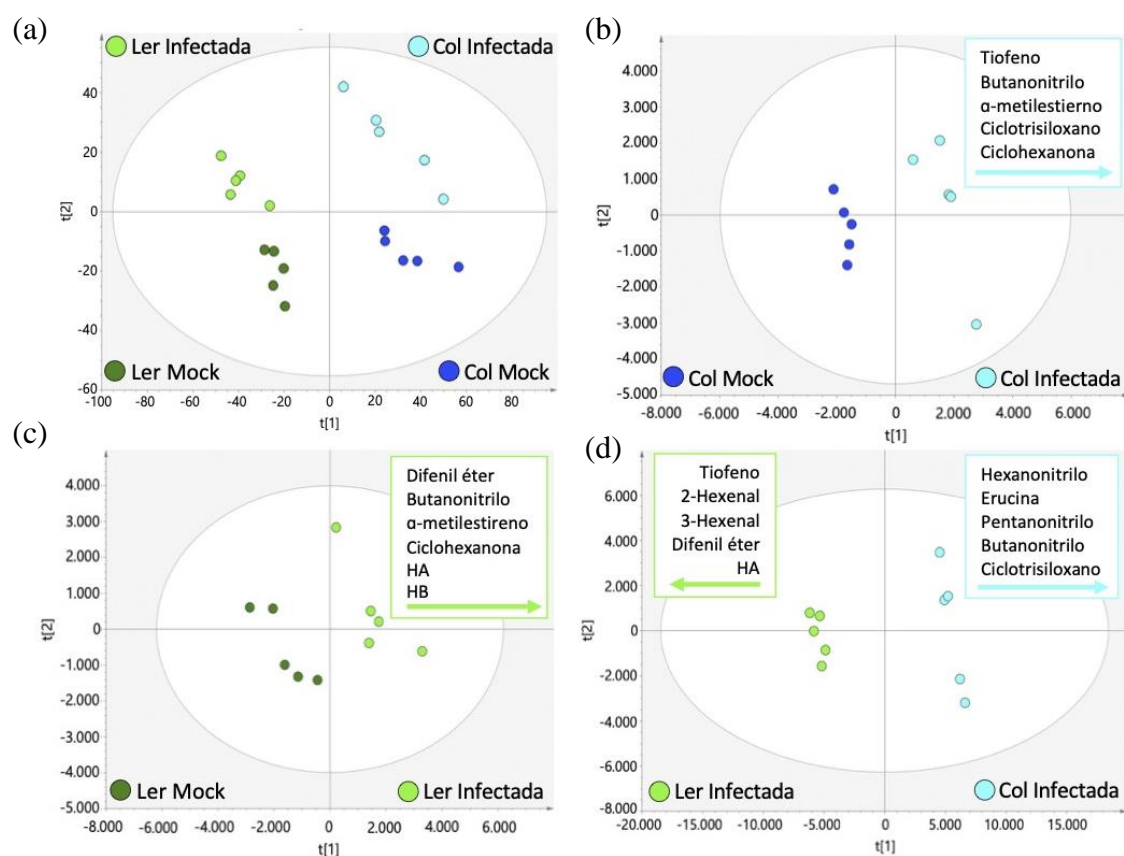


Figura 5. Score plots del análisis de compuestos volátiles por GC-MS/MS. Los colores azul y verde oscuros identifican las muestras Col-0 y Ler no infectadas, respectivamente; los colores azul y verde claros identifican las muestras Col-0 y Ler infectadas, respectivamente. $t[1]$ y $t[2]$ corresponden a las componentes 1 y 2, respectivamente. (a) Col-0 y Ler infectadas y no infectadas; (b) Col-0 infectada y no infectada; (c) Ler infectada y no infectada; (d) Col-0 y Ler infectadas.

Tras un primer análisis, se obtiene un *Score plot* en el que la componente 1 separa las observaciones en función del ecotipo mientras la componente 2 los separa en función de la infección; explicando el 27 % y el 10 % de la varianza, respectivamente (**Figura 5a**). Para obtener unas mejores diferencias entre los cuatro grupos, se realizaron *Score plots* independientes, dos de ellos para cada ecotipo y un tercero solo con las muestras infectadas. En los tres casos es la componente 1 la que diferencia las muestras, explicando un 20 % de la varianza para Col-0 infectada y no infectada (**Figura 5b**), un 27 % para Ler infectada y no infectada (**Figura 5c**), y un 74 % para Col-0 y Ler infectadas (**Figura 5d**).

Los *Loadings plots* de cada *Score plot* representan la distribución de las variables (iones) identificados en el análisis de GC-MS/MS (**Figura 6**).

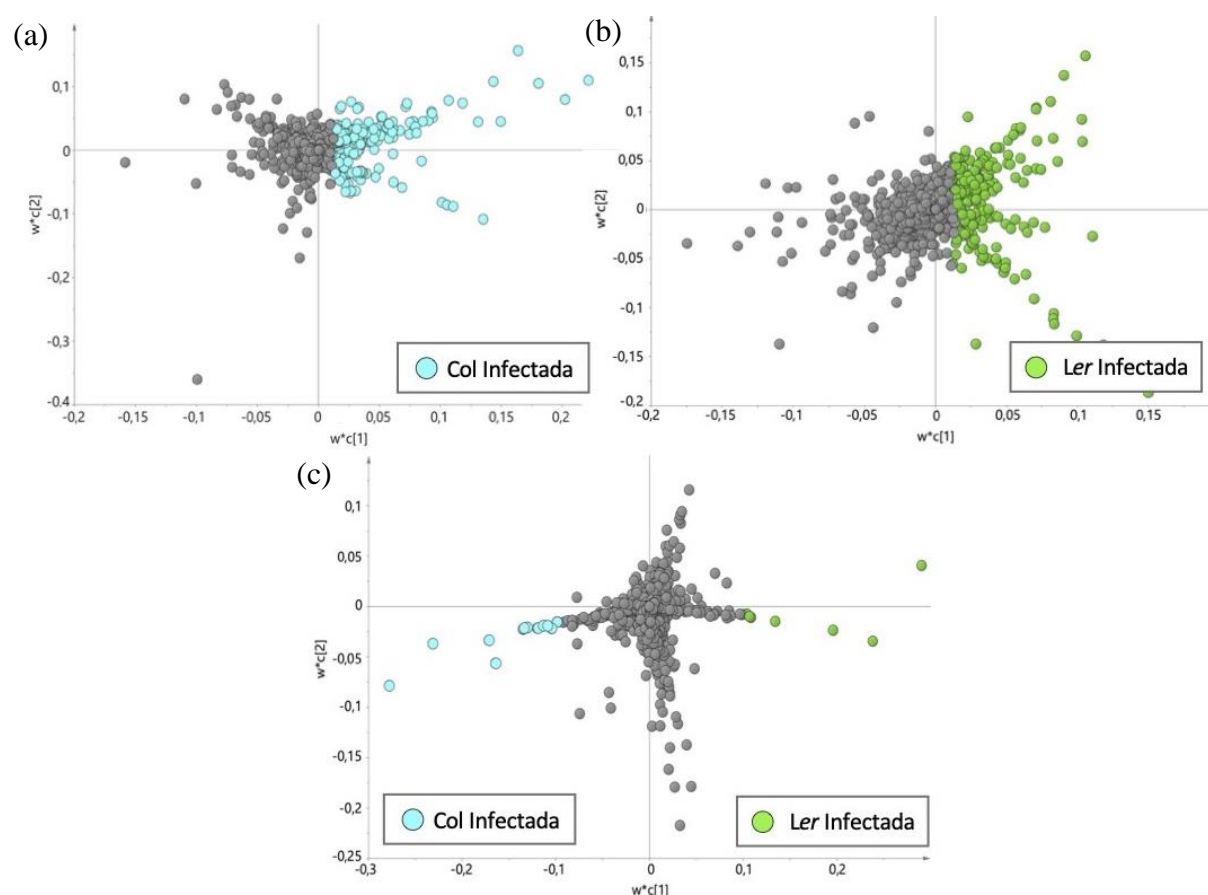


Figura 6. Loading plots del análisis de compuestos volátiles por GC-MS/MS. En color están marcados los iones utilizados para la identificación de los compuestos volátiles: azul y verde oscuros identifican las muestras Col-0 y Ler no infectadas, respectivamente; azul y verde claros identifican las muestras Col-0 y Ler infectadas, respectivamente. $w*c[1]$ y $w*c[2]$ corresponden a las componentes 1 y 2, respectivamente. (a) Col-0 infectada y no infectada; (b) Ler infectada y no infectada; (c) Col y Ler infectadas.

En los análisis del volatiloma emitido por Col-0 y *Ler* infectadas contra no infectadas (**Figura 6a y b**, respectivamente), la parte positiva de la componente 1 muestra los iones correspondientes a las muestras infectadas. En el caso de Col-0 infectada contra *Ler* infectada (**Figura 6c**), la parte positiva de la componente 1 contiene los iones que corresponden a Col-0 infectada y la negativa los que corresponden a *Ler* infectada. Como primer filtro se seleccionan los iones que se encuentran por encima de 0,01 en la componente positiva (coloreados en las figuras) en los dos primeros casos; en el último caso, se seleccionan los iones que se encuentran por encima de 0,1 y por debajo de -0,01 en la componente 1. Como segundo filtro, en todos los casos, se seleccionan aquellos que, además, tienen un *p-value* menor de 0,05. Así se identifican algunos compuestos que están más representados en una condición que en otra, o únicamente representados en una de las dos condiciones.

Además de esos volátiles identificados, se realizó una búsqueda dirigida en todas las muestras de dos volátiles de interés para este trabajo (ya que los iones que podrían pertenecer a ellos no superaron los filtros estadísticos). Estos volátiles fueron el HB y el α -terpineol. En las muestras en las que estaban presentes, se cuantificaron como el resto de los volátiles encontrados. Mientras que el HB se identificó en algunas muestras (su importancia se comenta más adelante en este apartado), el α -terpineol no se encontró en ninguna de las muestras, por lo que las plantas de *A. thaliana* parece que no producen α -terpineol, ni de forma constitutiva ni tras la infección con *Pst* DC3000.

Al analizar con más detalle los iones diferenciales encontrados entre cada comparación, pudimos relacionar estos iones con los compuestos que mejor explican las diferencias:

En el caso del ecotipo Col-0 (**Figura 7a**), encontramos el tiofeno, el cual se encuentra a gran concentración en la condición infectada pero no en la control. Este compuesto se describe en la bibliografía como insecticida, nematicida, antifúngico, germicida y citotóxico [26]. El butanonitrilo está presente 1,8 veces más en las plantas Col infectadas que en las no infectadas. El α -metilestireno se encuentra 1,9 veces más en las infectadas que en las no infectadas. Este compuesto se ha visto que se emite más en plantas al ser infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *japonica* [27]. El ciclotrisiloxano se encuentra 5,3 veces más representado, y se ha identificado como un compuesto con actividad antioxidante [28]. La ciclohexanona, por su parte, se encuentra casi 3 veces más representada en las plantas infectadas que en las no infectadas.

En el caso del ecotipo *Ler* (**Figura 7b**), volvimos a encontrar también más representados en las infectadas que en las no infectadas los volátiles butanonitrilo, α -metilestireno y

ciclohexanona (3,5, 1,4, y 3 veces, respectivamente). Como compuestos exclusivos de *Ler*, encontramos el difenil éter, presente 4 veces más en las infectadas que en las no infectadas. Este compuesto se utiliza como herbicida ya que inhibe un enzima implicado en la biosíntesis de clorofila [29]. Por otra parte, el HA también se encuentra casi 3 veces más representado en las infectadas que en las no infectadas. El HB buscado de manera dirigida está 1,2 veces más representado en las infectadas que en las no infectadas, pero sin significancia estadística.

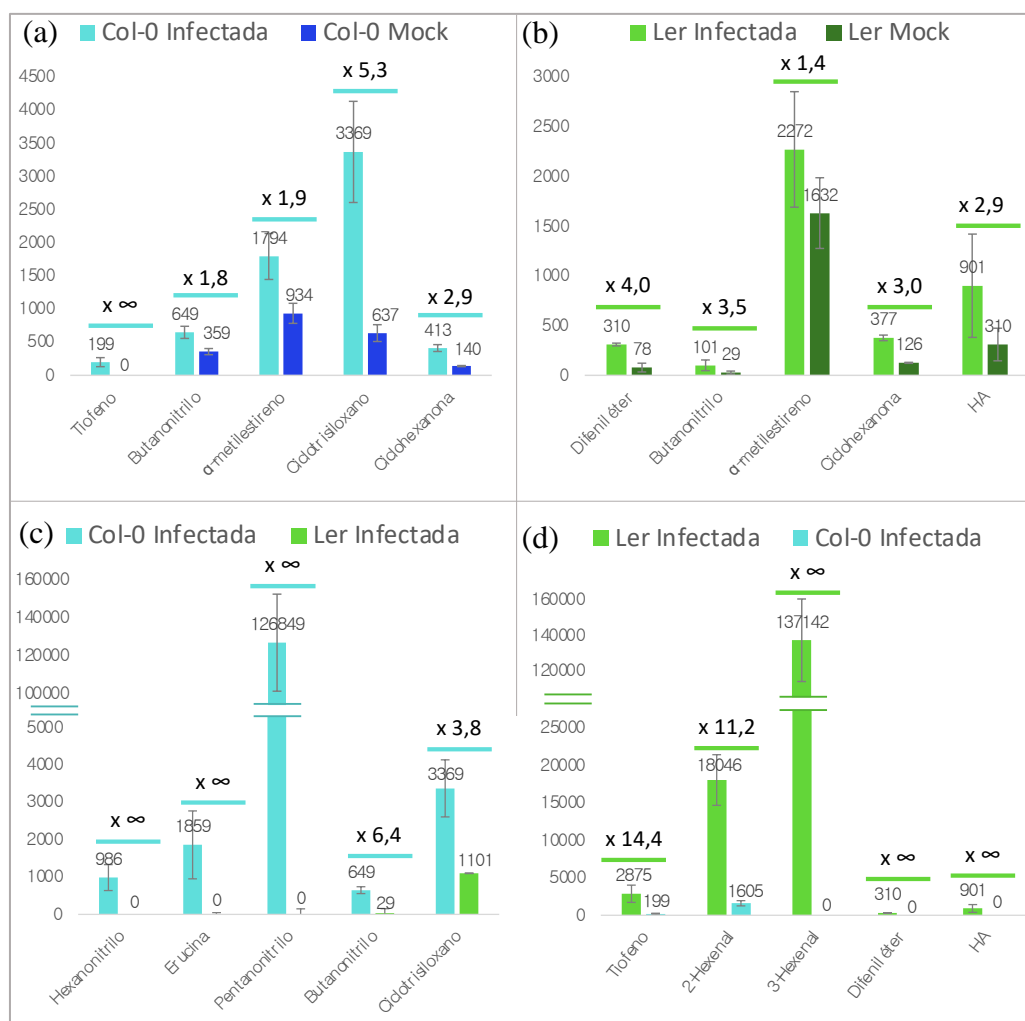


Figura 7. Cuantificaciones de los compuestos volátiles identificados en GC-MS/MS.

Encima de cada barra se indican las cuantificaciones de cada compuesto en cada condición. Encima de cada par de barras por compuesto se indica cuántas veces más está presente cada compuesto en la condición x frente a la y (x/y). Aquellos compuestos con infinito estaban presentes en la condición x pero no lo en la y. Solo se presentan aquellos compuestos en los que se encontró diferencias significativas en sus cuantificaciones entre los ecotipos y las condiciones.

Finalmente se realizó la comparación entre ambos ecotipos, Col-0 y *Ler*, infectados (**Figura 7c, d**). Las plantas *Ler* infectadas (**Figura 7d**), acumulan difenil éter, HA y 3-hexenal, mientras que en Col-0 no están presentes. El tiofeno y 2-hexenal se encontraban 14,4 y 12,1

veces más representados en *Ler* infectada respecto a Col-0 infectada. El primero se ha visto que promueve la susceptibilidad a *Pst* activando las rutas del ácido jasmónico en *Arabidopsis* [30], y el tratamiento de ambos compuestos en fresa ha disminuido la infección con *Botrytis cinerea* [31]. Por otra parte, las plantas Col-0 infectadas (**Figura 7c**) acumulan hexanonitrilo, erucina y pentanonitrilo (también nombrado nitrilo-erucina), mientras que en *Ler* no están presentes. El butanonitrilo y ciclotrisiloxano se encontraban respectivamente 6,4 y 3,8 veces en mayor cantidad en Col-0 infectada que en *Ler* infectada. El hexanonitrilo se ha visto que tiene actividad antimicrobiana [32], así como el pentanonitrilo [33].

4.2. Expresión de genes en respuesta a la infección

4.2.1. Infección de *A. thaliana* con *Pst* DC3000

Para intentar descubrir si la infección con *Pst* DC3000 podía alterar a nivel transcriptómico las posibles respuestas mediadas por HB, decidimos estudiar una serie de genes mediante qRT-PCR, en las plantas de *A. thaliana* ecotipos Col-0 y *Ler* infectadas y no infectadas, con muestras recogidas a uno y dos días tras la infección. Los genes que elegimos fueron:

- *PRI* [34], como marcador molecular que aumenta en respuesta a la infección;
- *MYB44* [13], *MYB60* [35] y *LOX1* [36] como genes que intervienen en el cierre estomático, un proceso básico en la defensa frente a *Pseudomonas syringae* que sospechamos puede estar mediado por HB. *MYB44* y *LOX1* se inducen con el cierre estomático; mientras que *MYB60* se reprime.
- Además *LOX1* [37] y *LOX2* [38], junto con *HPL1* [39], como genes de la biosíntesis de HB, para estimar si la infección provoca alguna respuesta que conlleve la síntesis de HB. *HPL1* no aparece en los resultados de las qRT-PCRs porque no se expresaba lo suficiente en las hojas de las muestras como para poder detectarlo.
- *LEA14* [40] y *AT5G48540* [41] como genes de respuesta de HB. Estos se han caracterizado como genes de respuesta en estudios de RNAseq realizados en el laboratorio (no publicados) en plantas de tomate tratadas con HB. *LEA14* se encuentra reprimido en plantas tratadas con HB, mientras que *AT5G48540* se encuentra inducido.

Del mismo modo, decidimos analizar si durante la infección con *Pseudomonas syringae* también estaba alterada la síntesis y respuesta al α -terpineol. *TPS23/27* [23] sería un buen gen marcador de biosíntesis de α -terpineol, de la ruta de la sesquiterpeno sintasa. Realizando

búsqueda bioinformática con la herramienta *Arabidopsis eFP Browser* de *The Bio-analytic Resource for Plant Biology* (BAR, <http://bar.utoronto.ca/>), se comprobó que este gen no se expresa lo suficiente en hojas de *A. thaliana* tras diferentes estreses (incluidos bióticos) como para ser detectado por qRT-PCR, de modo que no se utilizó para realizar los análisis. No se encontró ningún otro gen que pudiera estar implicado en la ruta de biosíntesis del α -terpineol en *Arabidopsis* que se expresara en cantidad suficiente en las hojas, igual que tampoco se encontraron genes de respuesta al α -terpineol en la bibliografía.

En el ecotipo Col-0 (**Figura 8**), los cambios transcriptómicos en general se comportan tal y como era esperado, *PR1* se induce en respuesta a la infección; el cierre estomático también parece inducido por la infección, pues los niveles de *MYB44*, *MYB60*, *LOX1* y *LOX2* se comportan según lo previsto, aunque hay que esperar al segundo día para ver cómo se reprime *MYB60*. Respecto a la síntesis de HB, tanto *LOX1* como *LOX2* se ven inducidos, lo que puede apuntar en la misma dirección observada que los incrementos de HB del apartado anterior. En los genes de respuesta de HB sí se observó una inducción en *AT5G48540*, pero no para el caso de *LEA14*.

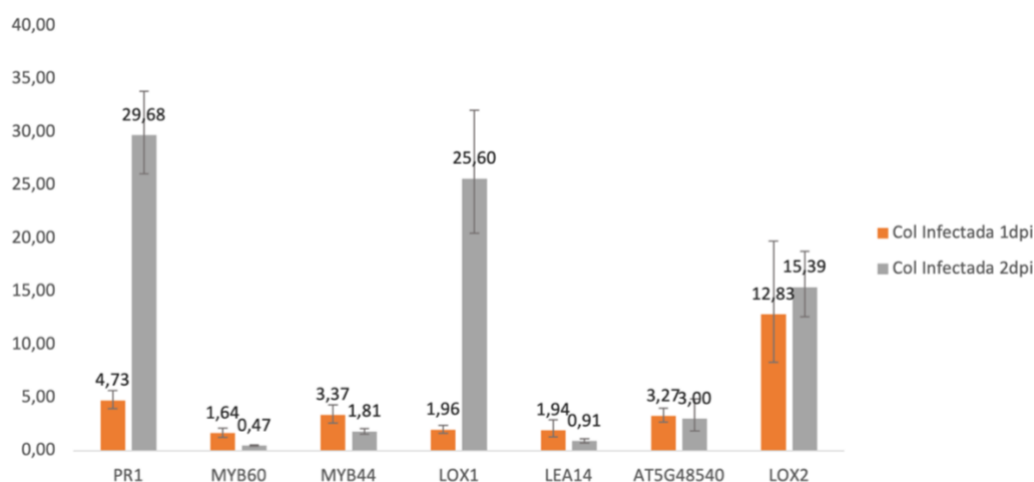


Figura 8. *Expresión relativa de genes marcadores de patógenesis y de respuesta a HB en Col-0. Se representa la relación de cada condición respecto a su control.*

Para el caso del ecotipo *Ler* (**Figura 9**), los cambios transcripcionales siguieron las mismas tendencias que en Col-0, siendo de nuevo *LEA14* el único gen que no respondió según lo previsto.

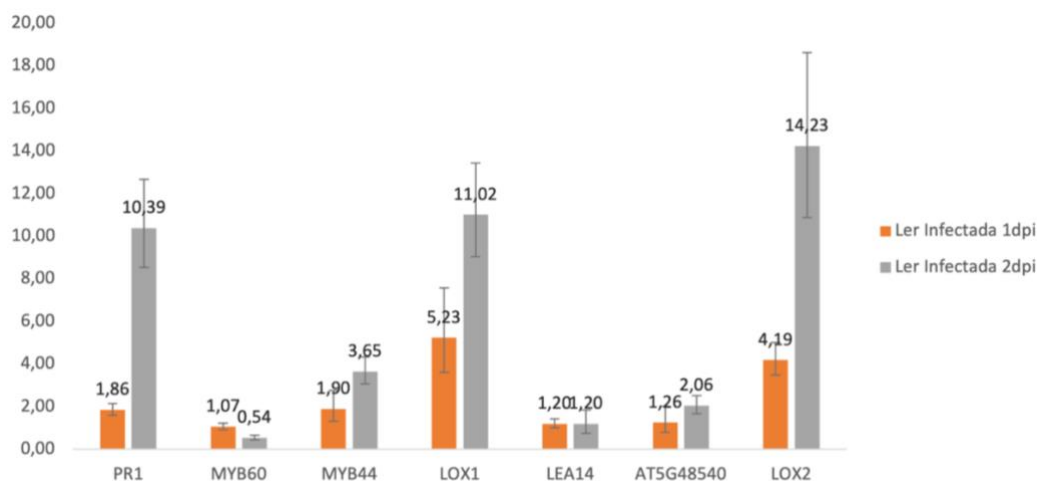


Figura 9. Expresión relativa de genes marcadores de patogénesis y de respuesta a HB en Ler. Se representa la relación de cada condición respecto a su control.

4.3. Pérdida de peso

Para comprobar los efectos de la aplicación de los compuestos volátiles HB y α -terpineol, sobre el cierre estomático en *A. thaliana*, se puso a punto un abordaje experimental en el cual monitorizamos la pérdida de peso de plántulas de Arabidopsis (ver Materiales y Métodos).

4.3.1. Tomate como control positivo de cierre estomático con tratamiento de volátiles: HB y α -terpineol

Como los efectos de HB [20, 21] y α -terpineol (datos del laboratorio no publicados) de inducción del cierre estomático se habían demostrado en hojas de tomate en trabajos previos de nuestro laboratorio mediante el conteo y fotografiado de estomas en hojas de tomate, se decidió usar el sistema de plántulas de tomate como un control experimental previo, para comprobar si este cierre estomático reducía la pérdida de peso.

Para ello se monitorizó la disminución de peso en plántulas de tomate sin tratar, tratadas con HB y tratadas con α -terpineol. Como se observa en la **Figura 10**, tanto las plantas tratadas con HB como las tratadas con α -terpineol mantienen mucho más peso que el control sin tratar y, por tanto, pierden menos peso por evapotranspiración. Estos resultados validan el diseño experimental para la comprobación de la eficiencia en el cierre estomático de los compuestos analizados.

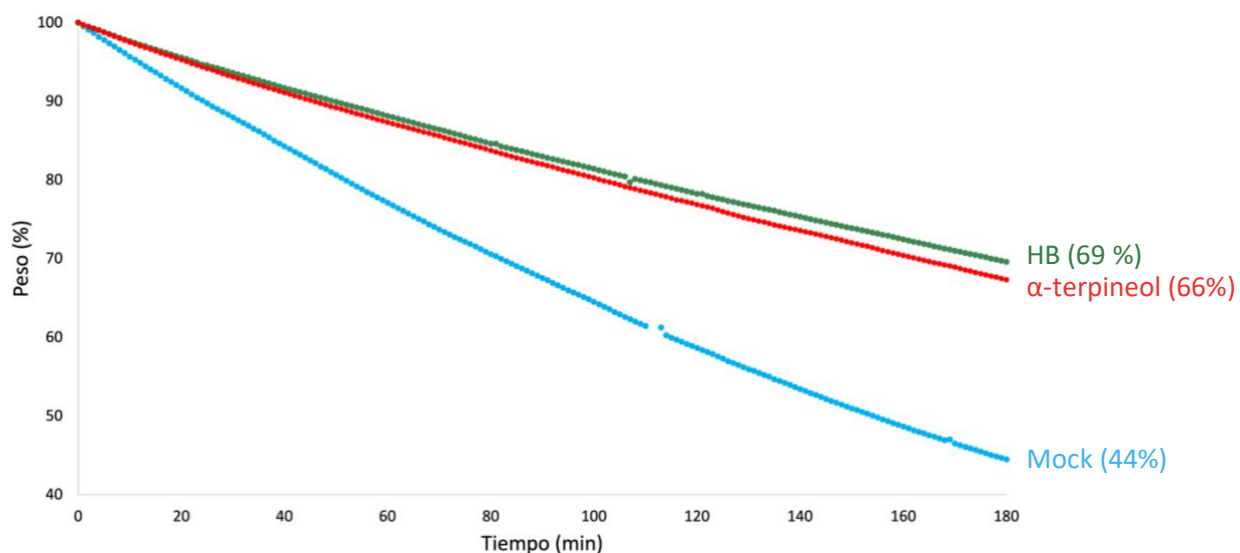


Figura 14. Pérdida de peso en plántulas de tomate. Se representa el porcentaje del peso de las plantas en cada momento, siendo el 100 % del peso las plantas a tiempo 0, y el 0 % el peso seco de las plantas (peso de la planta sin agua, 48 h después de sacarlas del cultivo in vitro y dejarlas secando a temperatura ambiente). En azul se representa el tratamiento control (mock), en verde el tratamiento con HB y en rojo con α -terpineol, 24 h antes de las tomas de los pesos. Entre paréntesis se indica el porcentaje de peso que se ha mantenido de cada planta tras los 180 minutos de medición.

4.3.2. *A. thaliana* tratada con volátiles (HB y α -terpineol)

Se utilizó el mismo sistema experimental para estudiar la eficiencia de pérdida de peso fresco de ambos compuestos en *A. thaliana*. En los tratamientos con HB de plántulas de *A. thaliana*, ecotipos Col-0 y *Ler* (**Figura 11a y b**, respectivamente), no se observó una menor pérdida de peso que en los controles. Aunque no se presenten todas las repeticiones realizadas, este experimento se realizó en numerosas ocasiones (n=7) y a diferentes horas del día. Entre todas ellas, la pérdida de peso en el tratamiento con HB con respecto al control fue muy errática, y por tanto no se puede concluir que el HB induzca el cierre de los estomas y las plantas pierdan menos agua.

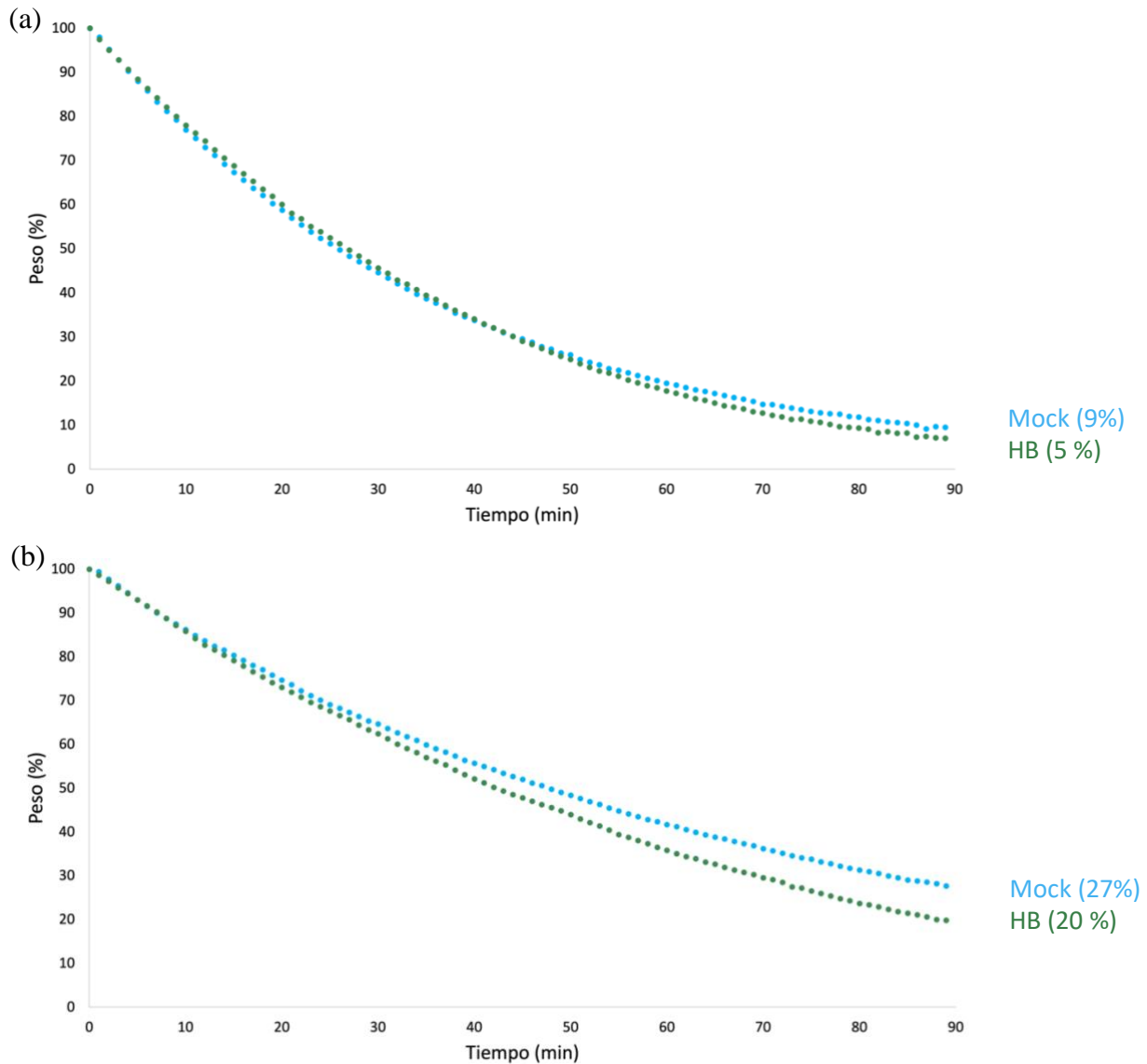


Figura 19. Pérdida de peso tras tratamiento con HB. (a) Ecotipo Col-0. (b) Ecotipo Ler. Se representa el porcentaje del peso de las plantas en cada momento, siendo el 100 % del peso las plantas a tiempo 0, y el 0 % el peso seco de las plantas (peso de la planta sin agua, 24 h después de sacarlas del cultivo in vitro y dejarlas secando a temperatura ambiente). En azul se representa el tratamiento control (mock) y en verde el tratamiento con HB 24 h antes de las tomas de los pesos. Entre paréntesis se indica el porcentaje de peso que se ha mantenido de cada planta tras los 90 minutos de medición.

En el tratamiento con α -terpineol de *A. thaliana*, tanto ecotipos Col-0 como *Ler* (**Figura 12a y b**, respectivamente), sí que se pudo observar que la pérdida peso era menor en las plántulas tratadas, por lo que sí mantienen más peso que en el caso del control y se supone que cierran sus estomas y así pierden menos agua. Este experimento también se realizó múltiples veces (n=3) con resultados similares.

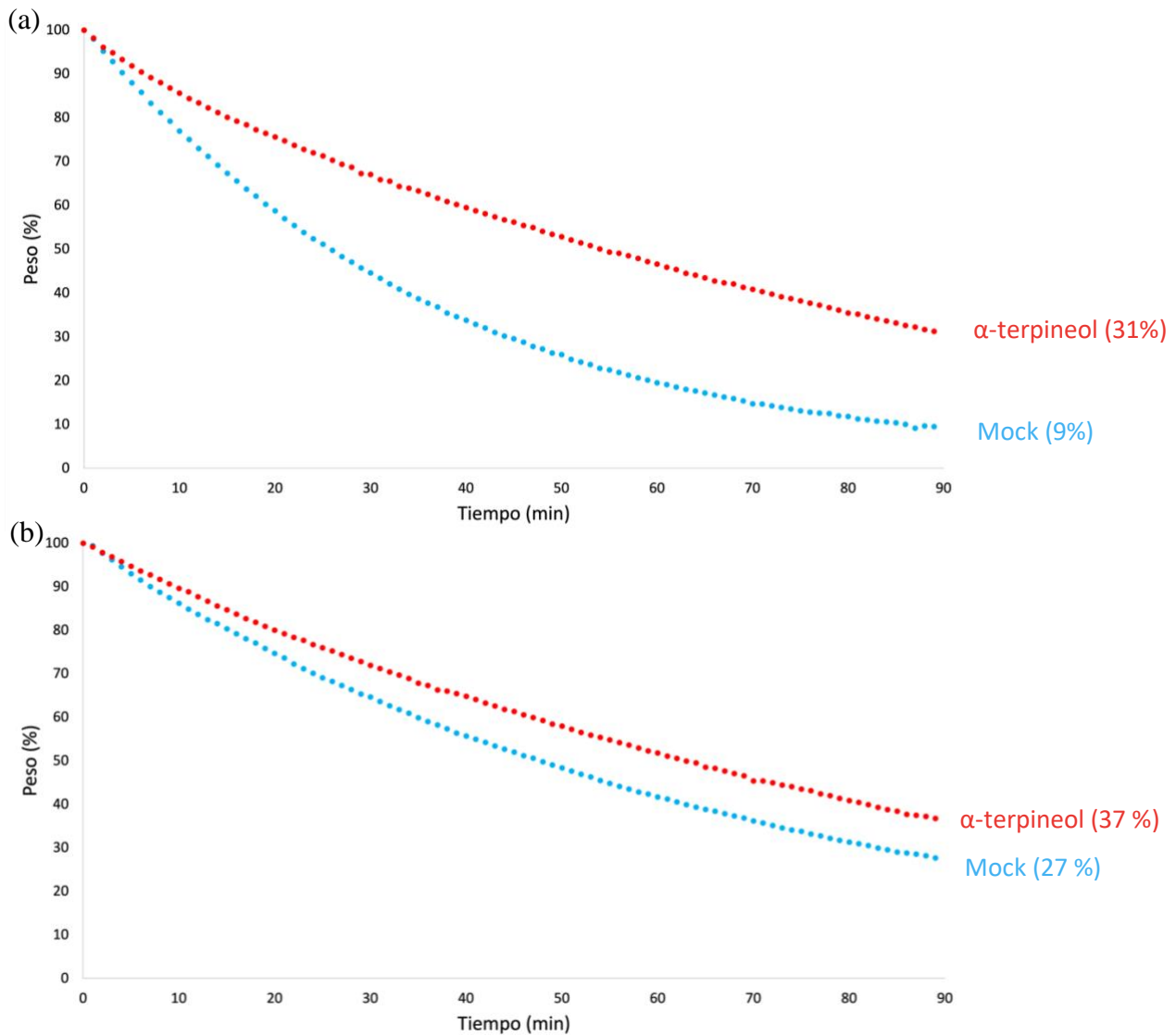


Figura 25. Pérdida de peso tras tratamiento con α -terpineol. (a) Ecotipo Col-0. (b) Ecotipo Ler. Se representa el porcentaje del peso de las plantas en cada momento, siendo el 100 % del peso las plantas a tiempo 0, y el 0 % el peso seco de las plantas (peso de la planta sin agua, 24 h después de sacarlas del cultivo in vitro y dejarlas secando a temperatura ambiente). En azul se representa el tratamiento control (mock) y en rojo el tratamiento con α -terpineol 24 h antes de las tomas de los pesos. Entre paréntesis se indica el porcentaje de peso que se ha mantenido de cada planta tras los 90 minutos de medición.

Por tanto, la puesta a punto de un diseño experimental nos ha permitido estudiar la eficiencia la pérdida de peso fresco en *A. thaliana*, indicando que únicamente el α -terpineol es eficaz.

4.4. Efecto del HB y el α -terpineol sobre dianas moleculares del cierre estomático en *Arabidopsis thaliana*

Para complementar el estudio del cierre estomático con los tratamientos con volátiles desde una perspectiva molecular, se realizaron análisis de expresión génica mediante qRT-PCR utilizando los marcadores de cierre estomático descritos anteriormente en este trabajo. Para las plantas tratadas con HB se estudiaron, además, los marcadores de síntesis y respuesta al HB.

En el tratamiento de las plantas de *Arabidopsis thaliana* con HB (**Figura 13**), en cuanto a los marcadores de cierre estomático, *MYB60* se reprime, tal y como se esperaba, al contrario que *MYB44* que debería aumentar su expresión, pero también se reprime; por su parte, el gen *LOX2* de síntesis de HB en Col-0 sí que se encuentra ligeramente inducido, pero no en *Ler*; y respecto a los de respuesta a HB, *LEA14* se comporta como era esperable en *Ler* pero no en Col-0, mientras que *AT5G48540* se expresa como era de esperar en Col-0 pero no en *Ler*. No podemos, por tanto, confirmar ni desmentir que ni el cierre estomático, ni la inducción del HB, ni la respuesta al mismo se dé a través de estas dianas moleculares al tratar con HB.

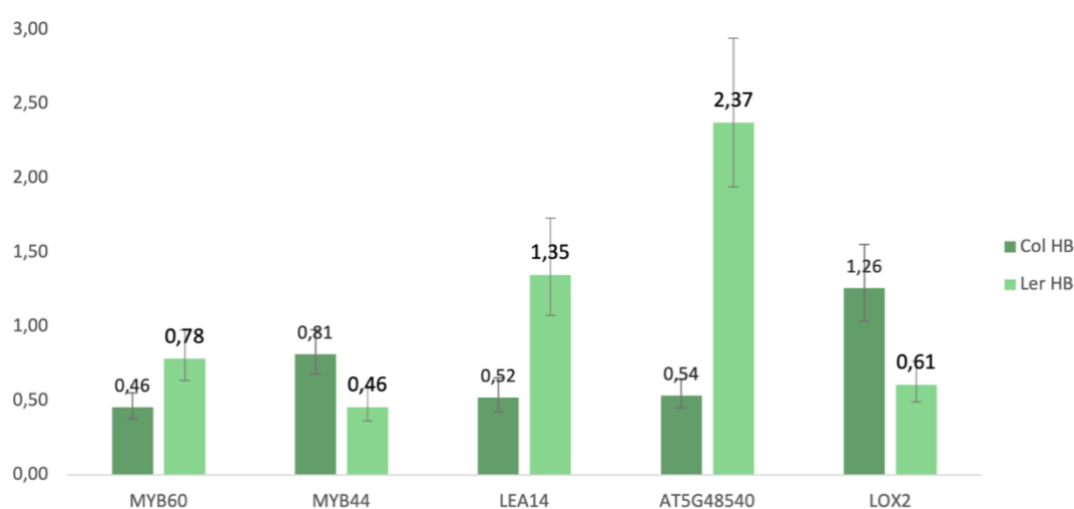


Figura 26. Expresión relativa de genes en Col-0 y Ler tratadas con HB. Se representa la relación de cada condición respecto a su control sin tratar.

Por su parte, al tratar con α -terpineol y estudiar la expresión de los genes relacionados con el cierre estomático se observa que, en ambos ecotipos, solamente *MYB60* se expresa conforme a lo esperado; *MYB44* y *LOX1* se comportan al revés (**Figura 14**). Tampoco se puede, por tanto, confirmar ni desmentir que al tratar con α -terpineol el cierre estomático se dé a través de estas dianas moleculares.

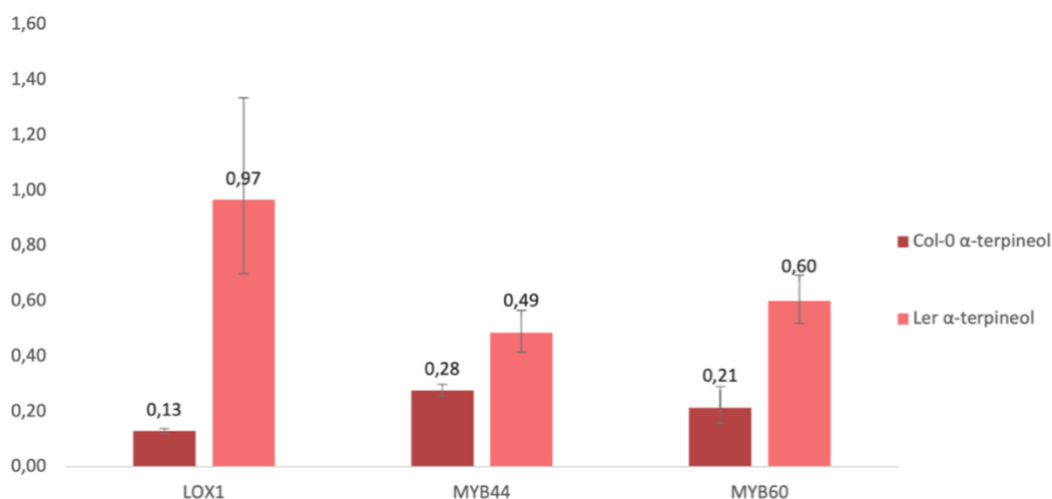


Figura 27. *Expresión relativa de genes en Col-0 y Ler tratadas con α -terpineol. Se representa la relación de cada condición respecto a su control sin tratar.*

No obstante, basándose en los buenos resultados del cierre estomático tras el tratamiento con α -terpineol en plántulas de *A. thaliana*, se realizaron tratamientos con α -terpineol y posterior infección con *Pst* DC3000. Lo que se pretendía en este caso era estudiar si la infección disminuía cuando las plantas habían sido previamente tratadas con α -terpineol, y si los mecanismos de defensa a la infección deberían verse aumentados.

Como en las qRT-PCRs previas de las infecciones las mayores diferencias de expresión se observaron a los dos días tras la infección (**Figura 8** y **Figura 9**), para este estudio se han realizado qRT-PCRs de muestras recogidas únicamente a ese tiempo.

Se analizan únicamente los genes marcadores de cierre estomático, ya que los de biosíntesis y respuesta a α -terpineol, como ya se ha comentado anteriormente (apartado 4.2.1), no se pueden analizar por qRT-PCR. Se vuelve a encontrar la situación en la que solamente la expresión de *MYB60* se comporta como se esperaría, reprimiéndose en ambos ecotipos (**Figura 15**) mientras que *LOX1* y *MYB44* no se inducen, cuando lo esperado es que lo hicieran. Se sigue sin poder concluir si se produce cierre estomático, pero, al menos, se puede deducir que seguramente no lo realice por estas vías.

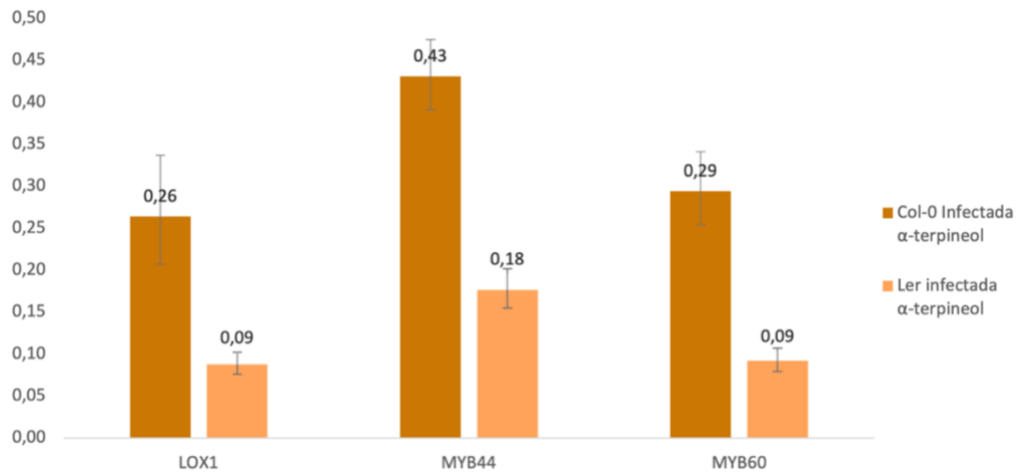


Figura 28. *Expresión relativa de genes en Col-0 y Ler tratadas con α -terpineol e infectadas. Se representa la relación de cada condición respecto a su control infectado sin tratar.*

Por otra parte, se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias de *Pst* DC3000 en las plantas infectadas y en las tratadas con α -terpineol e infectadas posteriormente (**Figura 16**). Mientras que en el ecotipo *Ler* no se observa una resistencia a la infección conferida por el tratamiento con α -terpineol, las plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 tratadas con α -terpineol mostraron una clara reducción en el número de UFC, indicando que el α -terpineol les confiere de alguna forma resistencia a la infección. Estos resultados correlacionan con la mayor eficiencia en el cierre estomático observado en el ecotipo Col-0 (**Figura 12**), y aunque no se haya encontrado α -terpineol en *A. thaliana* en nuestros análisis de volátiles (apartado 4.1), sí desencadena una respuesta en la planta frente a la infección con *Pst* DC3000 y podría postularse como un hipotético tratamiento preventivo ante la misma.

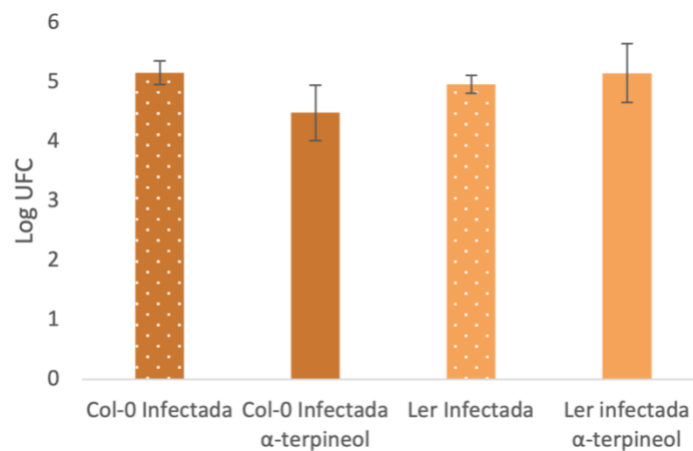


Figura 29. *Conteo UFC de infección combinada con α -terpineol.*

5. Conclusiones

Las conclusiones de este Trabajo de Fin de Máster son:

- La infección de *A. thaliana* con *Pst* DC3000 genera una respuesta diferencial entre los ecotipos Col-0 y Ler en la producción de compuestos volátiles. Además, esta respuesta es muy diferente a la que se produce en tomate, donde se induce la emisión de elevados niveles de butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) y α -terpineol.
- A diferencia de lo que ocurre en tomate, la aplicación de HB en *A. thaliana* no parece producir el cierre estomático ni conferir ningún tipo de mejora en la respuesta a infección con *Pst* DC3000.
- No se ha encontrado α -terpineol en las plantas de Arabidopsis. Sin embargo, su aplicación parece inducir el cierre estomático, y mejora la respuesta a infección con *Pst* DC3000, mediante mecanismos moleculares pendientes de elucidar.

6. Bibliografía

1. Arnold, D.L.; Preston, G.M. *Pseudomonas syringae*: enterprising epiphyte and stealthy parasite. *Microbiol. (United Kingdom)* **2019**, *165*, 251–253, doi:10.1099/mic.0.000715.
2. Xin, X.; He, S.Y. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annu. Review Phytopathol.* **2013**, *51*, doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102321.
3. Melotto, M.; Underwood, W.; He, S.Y. Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annu. Review Phytopathol.* **2008**, *46*, 101–122, doi:10.1146/annurev.phyto.121107.104959.
4. Baltrus, D.A.; Mccann, H.C.; Guttman, D.S. Genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae* Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Mol. Plant Pathol.* **2016**, *18*, 152–168, doi:10.1111/mpp.12506.
5. Cuppels, D.A. Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *51*, 323–327, doi:10.1128/aem.51.2.323-327.1986.
6. Whalen, M.C.; Innes, R.W.; Bent, A.F.; Staskawicz, B.J. Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean. *Plant Cell* **1991**, *3*, 49–59, doi:10.1105/tpc.3.1.49.
7. Boureau, T.; Routtu, J.; Roine, E.; Taira, S.; Romantschuk, M. Localization of hrpA-induced *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in infected tomato leaves. *Mol. Plant Pathol.* **2002**, *3*, 451–460, doi:10.1046/j.1364-3703.2002.00139.x.
8. Han, G.-Z. Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytol.* **2019**, *222*, 70–83, doi:10.1111/nph.15596.
9. Yu, X.; Feng, B.; He, P.; Shan, L. From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2017**, *55*, 109–137, doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035649.
10. Jones, J.D.G.; Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature* **2006**, *444*, 323–329, doi:10.1038/nature05286.
11. Meng, X.; Zhang, S. MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2013**, doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102314.
12. Hosy, E.; Vavasseur, A.; Mouline, K.; Dreyer, I.; Gaymard, F.; Pore, F.; Boucherez, J.; Lebaudy, A.; Bouchez, D.; Véry, A.-A.; et al. The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Plant Biol.* **2003**, *100*, 5549–5554, doi:10.1073/pnas.0733970100.

13. Hieno, A.; Naznin, H.A.; Hyakumachi, M.; Higuchi-Takeuchi, M.; Matsui, M.; Yamamoto, Y. Possible Involvement of MYB44 -Mediated Stomatal Regulation in Systemic Resistance Induced by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in Arabidopsis. *Microbes Environ.* **2016**, *31*, 154–159, doi:10.1264/jsme2.ME16025.
14. Cominelli, E.; Galbiati, M.; Vavasseur, A.; Conti, L.; Sala, T.; Vuylsteke, M.; Leonhardt, N.; Dellaporta, S.L.; Tonelli, C. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 1196–1200, doi:10.1016/j.cub.2005.05.048.
15. Panchal, S.; Melotto, M. Stomate-based defense and environmental cues. *Plant Signal. Behav.* **2017**, *12*, e1362517, doi:10.1080/15592324.2017.1362517.
16. Dudareva, N.; Klempien, A.; Muhlemann, J.K.; Kaplan, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* **2013**, *198*, 16–32, doi:10.1111/nph.12145.
17. ul Hassan, M.N.; Zainal, Z.; Ismail, I. Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnol. J.* **2015**, *13*, 727–739, doi:10.1111/pbi.12368.
18. Schneider, C.; Pratt, D.A.; Porter, N.A.; Brash, A.R. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol.* **2007**, *14*, 473–488, doi:10.1016/j.chembiol.2007.04.007.
19. López-Gresa, M.P.; Lisón, P.; Campos, L.; Rodrigo, I.; Rambla, J.L.; Granell, A.; Conejero, V.; Bellés, J.M. A non-targeted metabolomics approach unravels the VOCs associated with the tomato immune response against *Pseudomonas syringae*. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–15, doi:10.3389/fpls.2017.01188.
20. López-Gresa, M.P.; Payá, C.; Ozáez, M.; Rodrigo, I.; Conejero, V.; Klee, H.; Bellés, J.M.; Lisón, P. A new role for green leaf volatile esters in tomato stomatal defense against *Pseudomonas syringe* pv. *tomato*. *Front. Plant Sci.* **2018**, *871*, 1–12, doi:10.3389/fpls.2018.01855.
21. Payá, C.; Pilar López-Gresa, M.; Intrigliolo, D.S.; Rodrigo, I.; Bellés, J.M.; Lisón, P. (Z)-3-hexenyl butyrate induces stomata closure and ripening in *Vitis vinifera*. *Agronomy* **2020**, *10*, doi:10.3390/agronomy10081122.
22. Nishimura, M.T.; Dangl, J.L. Arabidopsis and the plant immune system. *Plant J.* **2010**, *61*, 1053–1066, doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04131.x.
23. Tholl, D.; Lee, S. Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arab. B.* **2011**, *9*, doi:10.1199/tab.0143.

24. Chen, F.; Ro, D.; Petri, J.; Gershenzon, J.; Bohlmann, J.; Pichersky, E.; Tholl, D. Characterization of a Root-Specific Arabidopsis Terpene Synthase Responsible for the Formation of the Volatile Monoterpene 1,8-Cineole. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1956–1966, doi:10.1104/pp.104.044388.1956.
25. Rambla, J.L.; López-Gresa, M.P.; Bellés, J.M.; Granell, A. Metabolomic Profiling of Plant Tissues. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1284*, 221–235, doi:10.1007/978-1-4939-2444-8_11.
26. Marotti, I.; Marotti, M.; Piccaglia, R.; Nastri, A.; Grandi, S.; Dinelli, G. Thiophene occurrence in different Tagetes species: Agricultural biomasses as sources of biocidal substances. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 1210–1217, doi:10.1002/jsfa.3950.
27. Brambilla, A.; Sommer, A.; Ghirardo, A.; Wenig, M.; Knappe, C.; Weber, B.; Amesmaier, M.; Lenk, M.; Schnitzler, J.-P.; Vlot, A.C. Immunity-associated volatile emissions of β -ionone and nonanal propagate defence responses in neighbouring barley plants. *J. Exp. Bot.* **2021**, *73*, 615–630, doi:10.1093/jxb/erab520.
28. Momin, K.; Thomas, S.C. GC–MS Analysis of antioxidant compounds present in different extracts of an endemic plant *Dillenia scabrella* (Dilleniaceae) leaves and barks. *IJPSR* **2020**, *11*, 2262–2273, doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).2262-73.
29. Camadro, J.M.; Matringe, M.; Scalla, R.; Labbe, P. Kinetic studies on protoporphyrinogen oxidase inhibition by diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* **1991**, *277*, 17–21, doi:10.1042/bj2770017.
30. Scala, A.; Mirabella, R.; Mugo, C.; Matsui, K.; Haring, M.A.; Schuurink, R.C. E-2-hexenal promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* by activating jasmonic acid pathways in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 1–11, doi:10.3389/fpls.2013.00074.
31. Wakai, J.; Kusama, S.; Nakajima, K.; Kawai, S.; Okumura, Y.; Shiojiri, K. Effects of trans-2-hexenal and cis-3-hexenal on post-harvest strawberry. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–5, doi:10.1038/s41598-019-46307-4.
32. Mastelić, J.; Blažević, I.; Kosalec, I. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Volatiles from *Degenia velebitica*, a European Stenoendemic Plant of the Brassicaceae Family. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 2755–2765, doi:10.1002/cbdv.201000053.
33. Radonić, A.; Blažević, I.; Mastelić, J.; Zekić, M.; Skočibušić, M.; Maravić, A. Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Cardaria draba* (L.) DESV. Volatiles. *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 1170–1181, doi:10.1002/cbdv.201000370.
34. Zhang, X.; Ménard, R.; Li, Y.; Coruzzi, G.M.; Heitz, T. Arabidopsis SDG8 Potentiates

- the Sustainable Transcriptional Induction of the Pathogenesis-Related Genes PR1 and PR2 During Plant Defense Response. **2020**, *11*, 1–14, doi:10.3389/fpls.2020.00277.
35. Oh, J.E.; Kwon, Y.; Kim, J.H.; Noh, H.; Hong, S.-W.; Lee, H. A dual role for MYB60 in stomatal regulation and root growth of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. *Plant Mol. Biol.* **2011**, 91–103, doi:10.1007/s11103-011-9796-7.
 36. Montillet, J.-L.; Leonhardt, N.; Mondy, S.; Tranchimand, S.; Chevalier, A.; Castresana, C.; Hirt, H.; Laurie, C. An Abscisic Acid-Independent Oxylin Pathway Controls Stomatal Closure and Immune Defense in Arabidopsis. *PLoS Biol.* **2013**, *11*, 13–15, doi:10.1371/journal.pbio.1001513.
 37. Vicente, J.; Cascón, T.; Vicedo, B.; García-Agustín, P.; Hamberg, M.; Castresana, C. Role of 9-Lipoxygenase and alpha-Dioxygenase Oxylin Pathways as Modulators of Local and Systemic Defense. *Mol. Plant* **2011**, *5*, 914–928, doi:10.1093/mp/ssr105.
 38. Mochizuki, S.; Sugimoto, K.; Koeduka, T.; Matsui, K. Arabidopsis lipoxygenase 2 is essential for formation of green leaf volatiles and five-carbon volatiles. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 1017–1027, doi:10.1002/1873-3468.12133.
 39. Duan, H.; Huang, M.; Palacio, K.; Schuler, M.A. Variations in CYP74B2 (Hydroperoxide Lyase) Gene Expression Differentially Affect Hexenal Signaling in the Columbia and Landsberg erecta Ecotypes. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 1529–1544, doi:10.1104/pp.105.067249.ber.
 40. Jia, F.; Qi, S.; Li, H.; Liu, P.; Li, P.; Wu, C.; Zheng, C. Overexpression of Late Embryogenesis Abundant 14 enhances Arabidopsis salt stress tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *454*, 505–511, doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.136.
 41. Chen, Z. A Superfamily of Proteins with Novel Cysteine-Rich Repeats. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 473–476.

7. Anexos

Anexo 1. Tabla de cuantificaciones de los compuestos volátiles identificados por GC-MS/MS. Se indican, de izquierda a derecha, el compuesto, el tiempo de retención (R.T) al que apareció el compuesto, el ion del compuesto que se utilizó para cuantificarlo, la media de las cuantificaciones de cada condición y su desviación estándar (SD).

Compuesto	R.T.	Ion Cuantificado	Media de las cuantificaciones				SD			
			Col		Ler		Col		Ler	
			Infectada	Mock	Infectada	Mock	Infectada	Mock	Infectada	Mock
Tiofeno	18.746	97	199	0	2875	3014	68,3	0,0	1148,8	1106,6
2-Hexenal	17.968	41	1605	1463	18046	15651	346,5	245,3	3374,2	3196,5
3-Hexenal	15.713	41	0	0	137142	128618	0,0	0,0	23362,1	15471,8
Hexanonitrilo	21.436	41	986	1161	0	0	346,1	414,4	0,0	0,0
Erucina	37.614	115	1859	1410	0	0	908,2	114,2	0,0	0,0
Pentanonitrilo	30.576	61	126849	104413	0	0	25683,8	1534,6	0,0	0,0
Difenil éter	36.967	170	0	0	310	78	0,0	0,0	13,7	43,5
Butanonitrilo	26.634	61	649	359	101	29	91,5	46,8	54,4	14,6
α -metilestireno	23.160	118	1794	934	2272	1632	346,8	151,3	580,3	355,5
Ciclotrisiloxano	21.508	207	3369	637	883	1101	762,6	126,6	367,6	596,6
Ciclohexanona	19.947	55	413	140	377	126	51,7	8,4	27,9	5,4
HA	23.348	43	0	0	901	310	0,0	0,0	519,6	163,7
HB	29.635	82	153	171	170	140	76,3	106,0	55,6	65,5