



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Ensayo de inducción de resistencia a *Phytophthora-capsici* en judía (*Phaseolus vulgaris*) con un cultivo esterilizado de Fo47

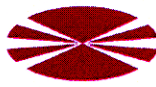


Trabajo de fin de grado

Curso 2013/2014

Grado en Biología

Marta Lois Alvedro



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

TRABALLO FIN DE GRAO

D. José Díaz Varela e D. Javier Veloso Freire autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao “Ensayo de inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en judía (*Phaseolus vulgaris*) con un cultivo esterilizado de Fo47” presentado por Marta Lois Alvedro para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña, a 10 de febreiro de 2014

Asdo.: José Díaz Varela

Asdo.: Javier Veloso Freire

Índice

Página

Resumen-Abstract -----	1
1. Introducción -----	2
2. Objetivos -----	12
3. Material y métodos	
3.1. Material vegetal-----	12
3.2. Método de tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47 -----	12
3.3. Material patógeno -----	13
3.4. Bioensayo de la severidad de la enfermedad con <i>Phytophthora capsici</i> -----	13
3.5. Toma de muestras y extracción de proteínas -----	13
3.6. Medida de proteínas totales-----	14
3.7. Medida de la actividad β -1,3-glucanasa-----	14
3.8. Análisis estadístico -----	15
4. Resultados	
4.1. Tratamiento de Fo47 contra <i>Phytophthora capsici</i> -----	15
4.2. Efecto del tratamiento de Fo47 en la actividad β -1,3-glucanasa -----	17
5. Discusión -----	18
6. Conclusiones-Conclusions -----	20
7. Referencias -----	21

Resumen

El agente de biocontrol *Fusarium oxysporum* Fo47 reduce los síntomas de diferentes enfermedades en plantas cultivadas. En este estudio se ha utilizado un cultivo esterilizado de Fo47 como elicitador para tratar plantas de judía que posteriormente se inocularon con el patógeno *Phytophthora capsici*. El tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47 redujo significativamente la infección por *P. capsici*, tratándose de un fenómeno de resistencia inducida. Además se determinó la actividad β -1,3-glucanasa, una enzima clasificada como proteína PR e implicada en la defensa de la planta frente a patógenos. El tratamiento con el elicitador de Fo47 no indujo la actividad β -1,3-glucanasa en las hojas de judía antes de la inoculación, pero sí provocó su aumento de forma significativa tras la inoculación con *P. capsici*, observándose por lo tanto un efecto de "priming".

Abstract

Fusarium oxysporum Fo47 is a biocontrol agent that reduces the symptoms of various diseases in cultivated plants. In this study we used a sterilized culture of Fo47 as elicitor for treating bean plants before inoculation with the pathogen *Phytophthora capsici*. Treatment with the sterilized culture of Fo47 reduced significantly the infection by *P. capsici*, being a phenomenon of induced resistance. Moreover, the β -1,3-glucanase activity was determined; this enzyme is classified as a PR protein and is involved in plant defense against pathogens. Treatment with the Fo47 elicitor did not induce β -1,3-glucanase activity in bean leaves before inoculation, but it caused a significantly increase in the activity after the inoculation with *P. capsici*, that is, a "priming" effect.

1. Introducción

La judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de mayor importancia a nivel mundial. Se cultiva ampliamente en el norte de España (Galicia y Asturias) por su alto valor de mercado y por su buena composición nutricional, suponiendo una importante fuente de proteínas y calorías (Santalla *et al.*, 1999; Ocampo *et al.*, 2005; Olmedilla-Alonso *et al.*, 2013). *Phytophthora capsici* es un patógeno que se distribuye mundialmente afectando a ciertos tipos de judía (Fig.1) (Gevens *et al.*, 2008).



Figura 1. Efecto de *P. capsici* en judía. Imágenes tomadas de Cornell University <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html>.

Este hongo patógeno fue descrito por primera vez en 1922 en plantaciones de pimiento en Nuevo Méjico (Leonian, 1922). Los organismos tradicionalmente considerados como “hongos” se ubican actualmente en tres reinos distintos, Chromista, Protozoa y Fungi. *P. capsici* pertenece al reino Chromista, encuadrado dentro de la clase Oomycetes (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los Oomycetes (Hawksworth *et al.*, 1995).

Reino	Clase	Orden	Familia	Género
Chromista	Oomycetes	Lagenidiales		
		Leptomitales		
		Saprolegniales	Saprolegniaceae	<i>Achlya</i> <i>Saprolegnia</i>
		Peronosporales	Pythiaceae	<i>Pythium</i> <i>Phytophthora</i>
			Peronosporaceae	<i>Bremia</i> <i>Peronospora</i>
		Albuginaceae	<i>Albugo</i>	

Los hongos verdaderos y los Oomicetos constituyen el grupo más importante de agentes causantes de enfermedades en las plantas, pero *Phytophthora* y otros oomicetos tienen unas características biológicas que no son comunes en los hongos verdaderos: la mayor parte del ciclo vital es diploide y poseen zoosporas biflageladas, mientras que en los hongos verdaderos es fundamentalmente haploide o dicariótico; las paredes celulares de los hongos verdaderos están compuestas principalmente por quitina, quitosano y, en muchas especies, también por glucano, mientras que las de los Oomicetos están compuestas principalmente de β -1,3-glucano y celulosa (Cavalier-Smith, 1998; García-Jiménez *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010).

P. capsici es un patógeno altamente dinámico y destructivo que causa podredumbre de tallos, hojas, raíces y frutos en un gran número de especies vegetales (Tabla 2). En 1988 causó graves daños en diferentes frutales y hortalizas en Florida, y en 1993 se registraron pérdidas cuantiosas en cultivos de pimiento, calabaza y sandía debido a la acción de este patógeno (Ploetz *et al.*, 2005). La presencia de *P. capsici* en cultivos de pimiento ha sido demostrada en otras zonas de España, especialmente en localidades mediterráneas como Tarragona, Valencia, Alicante y Murcia, pero Galicia es probablemente una de las zonas en las que más pérdidas ha provocado este patógeno en dichos cultivos (Bartual *et al.*, 1991; Pomar *et al.*, 2001). La enfermedad puede aparecer en cualquier etapa del ciclo de la planta, y los síntomas varían considerablemente en función de la especie de planta sobre la que actúa, las áreas de infección y las condiciones ambientales (Fig. 2) (Baysal *et al.*, 2005; Lamour *et al.*, 2012).

Tabla 2. Principales especies huésped de *P. capsici* (Erwin & Ribeiro, 1996; Gevens *et al.*, 2008; Lamour *et al.*, 2012).

Nombre común	Nombre científico	Familia
Algodón	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae
Aloe	<i>Aloe</i> sp.	Xanthorrhoeaceae
Berenjena	<i>Solanum melongena</i> L.	Solanaceae
Cacao	<i>Theobroma cacao</i> L.	Malvaceae
Calabacín	<i>Cucurbita pepo</i> L.	Cucurbitaceae
Calabaza	<i>Cucurbita maxima</i> Dcne.	Cucurbitaceae
Caqui	<i>Diospyros kaki</i> L.	Ebenaceae
Cebolla	<i>Allium cepa</i> L.	Amarillidaceae
Col	<i>Brassica oleracea</i> L.	Brasicaceae
Espinaca	<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste y Reyn.	Amaranthaceae
Guisante	<i>Pisum sativum</i> L.	Fabaceae
Judía	<i>Phaseolus</i> sp.	Fabaceae
Manzano	<i>Malus pumila</i> Mill.	Rosaceae
Melocotonero	<i>Prunus persica</i> L.	Rosaceae
Melón	<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.	Solanaceae
Papaya	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae
Pepino	<i>Cucumis sativus</i> L.	Cucurbitaceae
Sandía	<i>Citrullus lanatus</i> Thunb.	Cucurbitaceae
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.	Solanaceae
Vainilla	<i>Vanilla planifolia</i> Andr.	Orchidaceae
Zanahoria	<i>Daucus carota</i> L.	Apiaceae

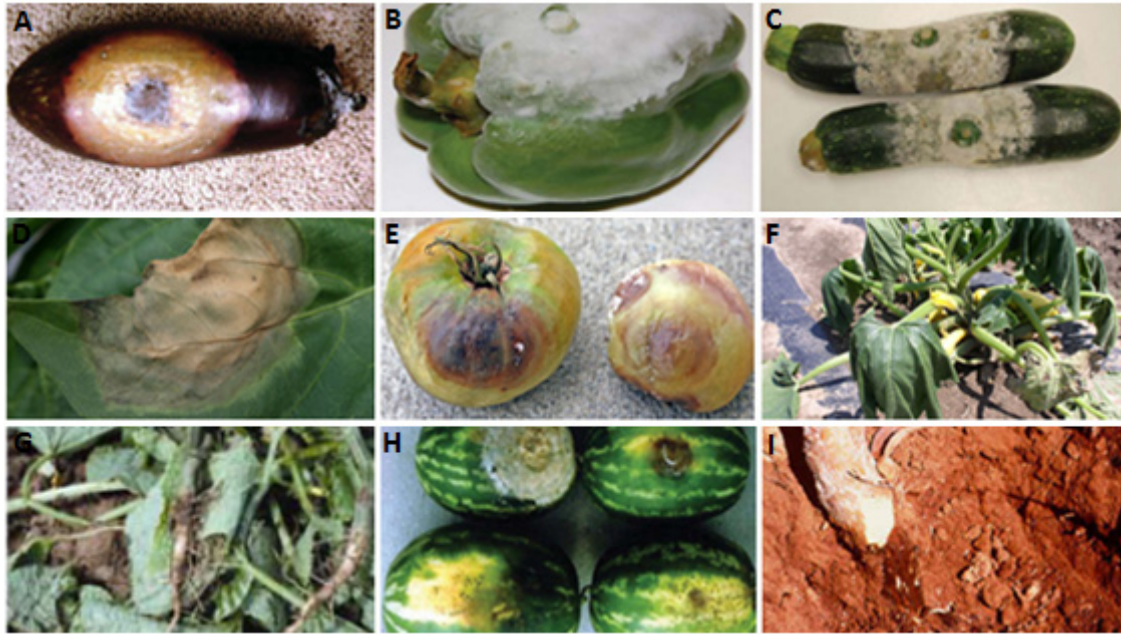


Figura 2. Síntomas provocados por *P. capsici* en diferentes huéspedes. (A) Podredumbre del fruto en berenjena; (B) Podredumbre del fruto en pimiento; (C) Podredumbre del fruto en calabacín; (D) Lesión en hoja de pimiento; (E) Infección en tomate; (F) Calabaza de verano afectada por *P. capsici*; (G) Pepino afectado por *P. capsici*; (H) Podredumbre del fruto en sandía; (I) Podredumbre de cuello en manzano. Imágenes tomadas de Gevenset *al.*, 2008 (A, B, C, H), de CornellUniversity <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html> (D, E, F), de Hausbeck & Lamour, 2004 (G) y de Diseases of UrbanPlants <http://ag.arizona.edu/pubs/diseases/az1124/#phyd> (I).

Phytophthora capsici presenta un ciclo de vida con fase sexual y fase asexual, lo que dificulta el control de la enfermedad (Koç & Üstün, 2012). Aproximadamente la mitad de las 60 especies reconocidas del género *Phytophthora* son homotáticas; en estas especies un único aislado es capaz de completar la fase sexual y formar oosporas. Sin embargo, la reproducción sexual de *P. capsici*, al tratarse de una especie heterotática, requiere la presencia de aislados de dos tipos de compatibilidad llamados A1 y A2; cuando los micelios de ambos tipos de compatibilidad entran en contacto comienza la producción de dos gametangios diferentes, anteridios y oogonios, que se fusionan entre sí formando oosporas diploides capaces de persistir en el suelo durante años y resistir las condiciones ambientales desfavorables (Fig. 3A). Las oosporas requieren cierto periodo de dormición, normalmente superior a ocho semanas, para germinar y producir micelios sexualmente viables (Fig. 3B). Las oosporas germinan produciendo tubos germinales que se ramifican dando lugar al micelio típico y/o producen esporangios y largos pedicelos (Bowers et al., 1990; Lamour & Hausbeck, 2003; García-Jiménez *et al.*, 2010; Jiménez-Díaz & Zabalgozcoa, 2010; Lamour *et al.*, 2012).

La reproducción asexual se da bajo condiciones ambientales favorables, en las que *P. capsici* puede producir un elevado número de esporangios en la superficie del tejido afectado (Fig. 3C,D). En el interior de los esporangios se produce la formación de zoosporas biflageladas que se liberan al medio en condiciones de lluvia o eventos de riego, desplazándose por quimiotaxis hacia la planta y siguiendo un geotropismo negativo (Fig. 3E,3F) (Lamour *et al.*, 2012). En el

caso de *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp., la quimiotaxis parece ser una respuesta inespecífica a ciertos aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, metionina), y al etanol secretado por las raíces en anaerobiosis asociada con la saturación acuosa en el suelo (Cooke & Whipps, 1993; Hardham, 1992). No obstante, en la inmediata proximidad de la superficie radical la quimiotaxis de las zoosporas es mediada en parte por campos eléctricos generados por las raíces como consecuencia de transporte iónico en su superficie, y son atraídas preferentemente por zonas anódicas o catódicas. El desplazamiento quimiotáctico finaliza con el enquistamiento de la zoospora, su adherencia a la superficie vegetal y la formación del tubo germinativo. La estimulación del enquistamiento da lugar a una serie de rápidos cambios estructurales en la zoospora, entre ellos la separación o retracción de los flagelos (Jiménez-Díaz & Zabalgoceazcoa, 2010; Lamour *et al.*, 2012). El material adhesivo está constituido fundamentalmente por glicoproteínas de alto peso molecular, y se encuentra almacenado en vesículas citoplásmicas localizadas periférica, central o dorsalmente en la zoospora desde las cuales es liberado para recubrir el quiste en formación (Hardham, 1992). La formación del tubo germinativo implica que, con la ayuda de enzimas secretadas, penetre en la cutícula de la planta directamente y colonice los tejidos huésped (Feng *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Lamour *et al.*, 2012). En algunos casos pueden observarse apresorios en la zona de infección, estructuras especializadas para penetrar tejidos adultos intactos que proporcionan al patógeno adherencia a la superficie del huésped como preparación para la invasión subsiguiente (Jiménez-Díaz & Zabalgoceazcoa, 2010; Lamour *et al.*, 2012). *P. capsici* también puede infectar partes aéreas de la planta, como frutos y hojas. La penetración de la superficie de las hojas por *P. capsici* ocurre directamente o a través de aberturas naturales como los estomas (Hausbeck & Lamour, 2004).



Figura 3. Estructuras reproductoras de *P. capsici*. (A) Oosporas; (B) Oospora empezando a germinar; (C) Esporangio de *P. capsici*; (D) Esporangios producidos en la superficie de una planta infectada; (E) Esporangio empezando a liberar las zoosporas que lleva en su interior; (F) Esporangio liberando las zoosporas. Imágenes tomadas de Cornell University <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html> (A, B, C, D, E) y de Gevens *et al.*, 2008 (F).

Este oomiceto puede crecer a temperaturas entre 7 y 37°C, pero las temperaturas de 27-32°C son óptimas para la producción de zoosporas y el proceso de infección (Fig. 4). En condiciones óptimas (27-32°C y alta humedad relativa) el tiempo desde la infección hasta la esporulación

es de 2-3 días, por lo que *P. capsici* puede afectar rápidamente a campos de cultivo enteros (Gevens *et al.*, 2008; Lamour *et al.*, 2012).

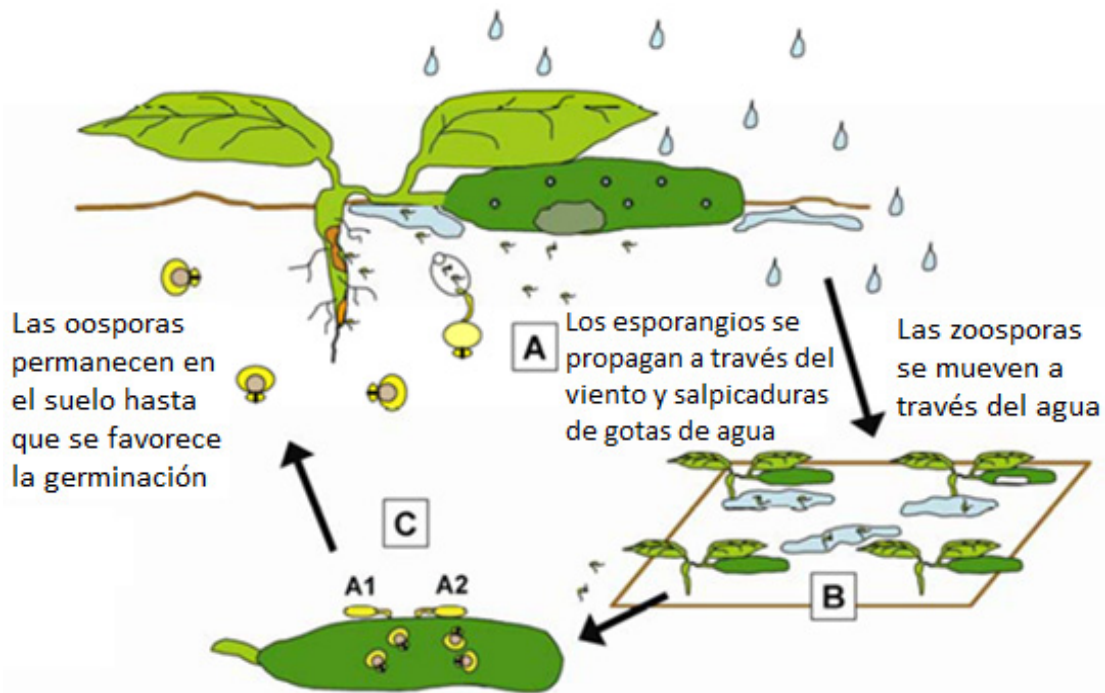


Figura 4. Ciclo de infección de *P. capsici* en pepino. (A) Las oosporas latentes germinan en condiciones de elevada humedad para producir esporangios que pueden germinar directamente o liberar zoosporas. Los esporangios se producen en las raíces, tallos y frutos de las plantas infectadas; (B) Los esporangios y las zoosporas se propagan por el agua de lluvia, riego o drenaje, que pueden saturar los suelos y contribuir a múltiples ciclos de inóculo que impulsan la enfermedad durante una sola temporada de crecimiento; (C) Las oosporas se forman cuando los tipos de compatibilidad A1 y A2 se encuentran en estrecha proximidad; las oosporas son capaces de sobrevivir durante años en el suelo. Tomado y modificado de Hausbeck & Lamour (2004).

P. capsici es considerado un organismo hemibiotrofo (Fig. 5). La estrategia de infección de los hongos fitopatógenos hemibiotrofos se caracteriza por una fase inicial de crecimiento periplásmico y biotrófico de hifas intracelulares especializadas en la célula invadida, seguida por el desarrollo de hifas secundarias que necrosan los tejidos vegetales con antelación a su invasión (Jiménez-Díaz & Zabalgoeazcoa, 2010). En la primera fase *P. capsici* actúa como un organismo biotrofo y las células de la planta infectada no parecen estar afectadas; en la segunda fase *P. capsici* actúa como un organismo necrotrofo, matando las células infectadas y causando necrosis y colapso tisular. El colapso tisular es seguido de la aparición de los esporangios, lo que proporciona los medios necesarios para la dispersión y el comienzo de un nuevo ciclo de infección (Lamour *et al.*, 2012). El periodo de tiempo que transcurre entre la fase biotrófica y la fase necrotrofica supone un problema para el agricultor, ya que en el momento de la cosecha parece no haber síntomas evidentes en los frutos (biotrofia) y cuando éstos son almacenados y llegan al mercado, los síntomas aparecen bien visibles (necrotrofia) (Hausbeck & Lamour, 2004; Lamour *et al.*, 2012). Se hacen necesarios, por lo tanto, los métodos de control de la enfermedad.

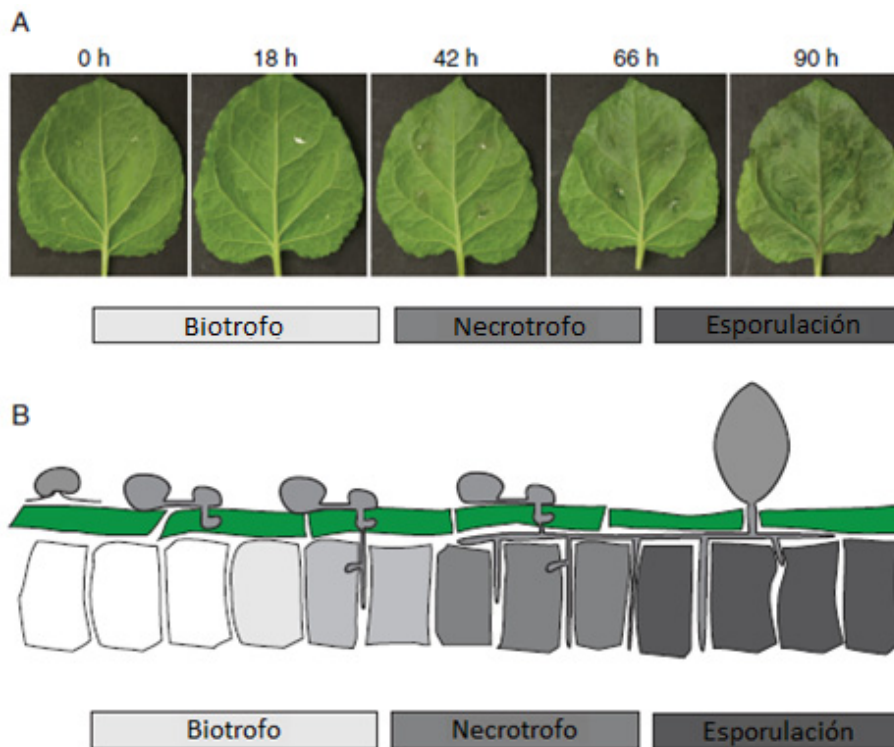


Figura 5. Estudio de la interacción *P. capsici*-huésped en *Nicotiana benthamiana*. (A) Ensayo del efecto de la infección de *P. capsici* en hojas de *N. benthamiana*; (B) Representación esquemática del proceso de infección en hojas de *N. benthamiana*. Tomado de Lamouret *et al.*, 2012.

Una de las estrategias más prometedoras en el control de los agentes patógenos de plantas es el manejo de la resistencia inducida. En los últimos años ha habido un gran número de estudios destinados a comprender cuál es la mejor forma de emplear esta estrategia para lograr la protección de cultivos (Walters *et al.*, 2013). Esta resistencia puede ser inducida en plantas tanto a nivel local como sistémico, y, a pesar de que rara vez se consigue el control completo del patógeno, la principal ventaja de esta estrategia es que protege a las plantas contra una amplia gama de patógenos (Kuc, 1982; Díaz *et al.*, 2005). Este tipo de resistencia a la infección por patógenos puede ser inducida en las plantas por una amplia gama de agentes bióticos y abióticos (Tabla 3) (da Rocha & Hammerschmidt, 2005; Lyon, 2007; Walters *et al.*, 2013). Entre los agentes bióticos encontramos una gran variedad de microorganismos que son utilizados en la inducción de resistencia, incluyendo virus, bacterias, levaduras y hongos, siendo algunos patógenos de plantas y otros no (Díaz *et al.*, 2005).

En términos generales, la resistencia inducida se puede dividir en dos tipos principales, la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR) (Fig. 6). Ambas respuestas, junto con otras formas de resistencia inducida, representan una forma atractiva para el manejo de enfermedades de los cultivos de manera sostenible en el marco de un sistema de agricultura convencional (Vallad & Goodman, 2004).

Tabla 3. Ejemplos de elicitores de resistencia y agentes inductores de resistencia con demostrada capacidad de control de enfermedades de plantas (tomado y modificado de Walters *et al.*, 2013).

Tipo de elicitor/ inductor de resistencia	Planta protegida	Patógeno	Referencia
Inductores biológicos Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal <i>Ochrobactrum lupine/ Novosphingobium pentaromativorans</i>	Pimiento	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Hahm <i>et al.</i> (2012)
<i>Azospirillum brasilense</i> REC3	Fresa	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Tortora <i>et al.</i> (2012)
<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	Fresa	<i>Sphaerotheca macularis</i>	Lowe <i>et al.</i> (2012)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r	Arabidopsis	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	Weller <i>et al.</i> (2012)
Hongos promotores del crecimiento vegetal <i>Fusarium equiseti</i>	Pepino	<i>Colletotrichum orbiculare Rhizoctonia solani</i>	Saldajeno & Hyakumachi (2011) Saldajeno & Hyakumachi (2011)
Biocontrol fúngico <i>Trichoderma asperellum</i> SKT-1	Arabidopsis	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	Yoshioka <i>et al.</i> (2012)
<i>T. harzianum</i> T39	Vid	<i>Plasmopara viticola</i>	Perazzolli <i>et al.</i> (2011)
<i>T. harzianum/T. atroviride</i>	Tomate	<i>Botrytis cinerea</i>	Tucci <i>et al.</i> (2011)
<i>T. atroviride</i>	Pino	<i>Diplodia pinea</i>	Reglinski <i>et al.</i> (2012)
<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47	Pimiento	<i>Phytophthora capsici/Verticillium dahliae</i>	Veloso & Díaz (2012)
Hongos micorrízicos arbusculares <i>Glomus intraradices</i> <i>Glomus mosseae</i>	Arroz Maíz	<i>Magnaporthe oryzae Rhizoctonia solani</i>	Campos-Soriano <i>et al.</i> (2012) Song <i>et al.</i> (2011)
Endófitos <i>Piriformospora indica</i>	Cebada	<i>Blumeria graminis f.sp. hordei</i>	Molitor <i>et al.</i> (2011)
Extractos de algas <i>Ulva armoricana</i>	Judía/vid/ pepino	<i>Erysiphe polygoni, Erysiphe necator, Sphaerotheca fuliginea</i>	Jaulneau <i>et al.</i> (2011)
<i>Ulva lactuca</i>	Tomate	<i>Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici</i>	El Modafar <i>et al.</i> (2012)
Inductores químicos y no biológicos Acibenzolar-S-metil (ASM)	Calabacín Haba Tomate	<i>Phytophthora capsici Uromyces viciae-fabae Ralstonia solanacearum Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici Xanthomonas spp.</i>	Ji <i>et al.</i> (2011) Sillero <i>et al.</i> (2012) Hong <i>et al.</i> (2011) Abo-Elyousr <i>et al.</i> (2012) Myresiotis <i>et al.</i> (2012)
Ácido β-aminobutírico (BABA)	Tomate	<i>Phytophthora infestans</i>	Huang <i>et al.</i> (2012)
Fosfito potásico	Arabidopsis	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Sharma <i>et al.</i> (2012)
Carbón vegetal (Biochar)	Tomate	<i>Botrytis cinerea</i>	Elad <i>et al.</i> (2010)
	Espárrago	<i>Fusarium oxysporum/F. proliferatum</i>	Elmer and Pignatello (2011)

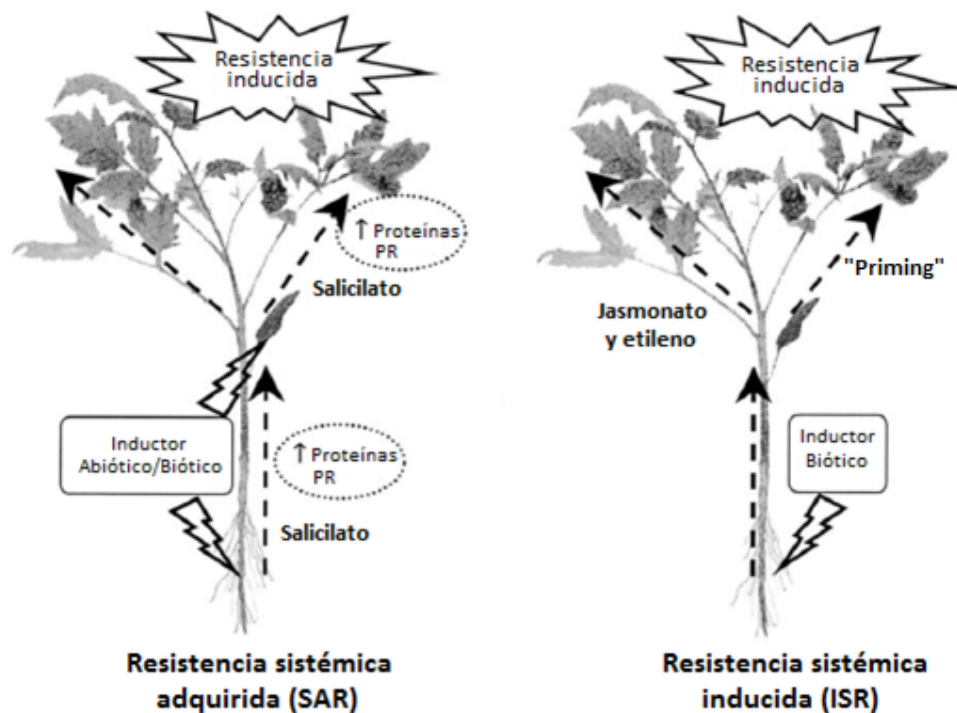


Figura 6. Comparación gráfica de los dos tipos de resistencia inducida mejor caracterizados en plantas: SAR e ISR. Ambas respuestas se entrelazan molecularmente, tal y como se demuestra por su dependencia de una versión funcional del gen *NPR1* en *Arabidopsis thaliana*. La flecha discontinua indica la transmisión de una señal por el floema. Tomado y modificado de Vallad & Goodman (2004).

La resistencia sistémica adquirida es una respuesta inducida por la necrosis de un tejido que conduce a una resistencia generalizada en toda la planta frente a un amplio espectro de patógenos biotrofos (Nuez *et al.*, 2004). Está asociada a la respuesta al ácido salicílico y a una alta expresión de proteínas PR ("Pathogenesis-Related proteins"), proteínas de la planta huésped cuya expresión se induce en situaciones de patogénesis o en situaciones relacionadas (Tabla 4) (Hammerschmidt, 1999; van Loon, 1999; Vallad & Goodman, 2004). Aunque el mayor interés de estas proteínas reside en su función en la respuesta de defensa de las plantas, se sabe que también participan en otros procesos fisiológicos del desarrollo de la planta, incluyendo la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico, la fertilización, la embriogénesis, la maduración del fruto, y la germinación de la semilla y la movilización de las reservas del endospermo del grano de cereales (San-Segundo & Coca, 2004). Algunas familias de proteínas PR poseen actividades conocidas, como ocurre con la familia PR-2 (β -1,3-glucanasas) (Saikia *et al.*, 2005; Govindappa *et al.*, 2010). Se han encontrado diferentes isoformas de β -1,3-glucanasas en un gran número de especies de plantas, incluyendo la judía (Awade *et al.*, 1989). Está ampliamente demostrado que las β -1,3-glucanasas participan en la defensa de las plantas frente a hongos fitopatógenos, bien solas o en combinación con las quitinasas (familias PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11). Estas hidrolasas pueden actuar por dos vías diferentes: directamente, degradando la pared del patógeno; e indirectamente, provocando la liberación de compuestos de la pared del hongo que actuarían como inductores de la respuesta de defensa de la planta (San-Segundo & Coca, 2004). La pared celular de *P. capsici* está compuesta principalmente de β -1,3-glucano y celulosa; las β -1,3-glucanasas actúan

directamente sobre el patógeno degradando el β -1,3-glucano de su pared celular, contribuyendo así a la defensa de la planta atacada (Balasubramanian *et al.*, 2012).

Tabla 4. Familias de proteínas PR según van Loon (1999).

Familia	Representante	Propiedades/actividad
PR-1	PR-1a de tabaco	Desconocida
PR-2	PR-2 de tabaco	β -1,3-glucanasa
PR-3	Proteína P, Q de tabaco	Quitinasa tipo I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Proteína R de tabaco	Quitinasa I, II
PR-5	Proteína S de tabaco	Tipo taumatina
PR-6	Inhibidor I de tomate	Inhibidor de proteinasas
PR-7	Proteína P ₆₀ de tomate	Endoproteinasa
PR-8	Quitinasa de pepino	Quitinasa tipo III
PR-9	Peroxidasa de tabaco	Peroxidasa
PR-10	Proteína PR1 de perejil	Tipo ribonucleasa
PR-11	Quitinasa clase V de tabaco	Quitinasa tipo I
PR-12	Proteína R _s -AFP3 de rábano	Defensina
PR-13	Proteína THI2,1 de <i>Arabidopsis</i>	Tionina
PR-14	Proteína LTP4 de cebada	Proteína transportadora de lípidos
PR-15	Proteína OxOa de cebada	Oxalato oxidasa
PR-16	Proteína OxOLP de cebada	Tipo oxalato oxidasa
PR-17	PRp27 de tabaco	Desconocida

La resistencia sistémica inducida es otro tipo de respuesta inducida que conduce a resistencia generalizada. Es desencadenada por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y por algunos hongos, como *Penicillium simplicissimum* o *Trichoderma* sp. (Walters *et al.*, 2013). Se caracteriza por estar mediada por rutas de señalización dependientes del ácido jasmónico y el etileno, siendo independiente de la acumulación de ácido salicílico y de la acumulación de proteínas PR (Pieterse & Van Loon 1999; Nuez *et al.*, 2004; Vallad & Goodman, 2004; Gutiérrez & de la Torre-Almaraz, 2007). Ciertos cambios bioquímicos característicos de las plantas que expresan ISR se hacen evidentes sólo en respuesta a una infección adicional y sólo en partes de la planta donde se requiere una resistencia efectiva. Este fenómeno ha sido descrito como “priming”, y se traduce en una respuesta más rápida y fuerte al ataque del patógeno (Sticher *et al.*, 1997; Conrath *et al.*, 2001; Goellner & Conrath, 2008).

Las rutas SAR e ISR están reguladas por la expresión del gen *NPR1*. Esta evidencia supone que las diferencias entre la ruta ISR y la ruta SAR son debidas a la activación del gen *NPR1*, capaz de distinguir entre la presencia de rizobacterias o de ácido salicílico en la planta para producir dos tipos de respuesta, o bien activando la expresión de los genes PR que desencadenan la respuesta tipo SAR o bien activando el “priming” en la ISR (Fig. 7) (García-Mas *et al.*, 2004).

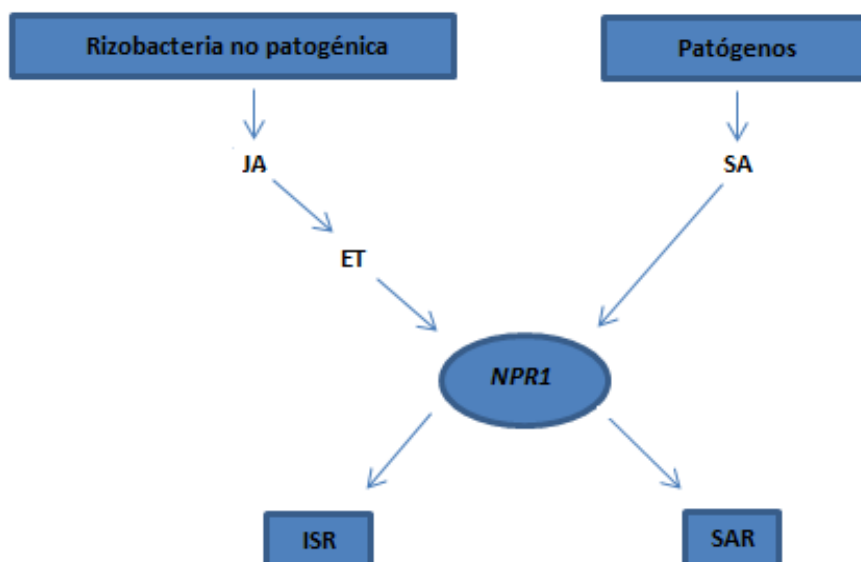


Figura 7. Papel central del gen *NPR1* en las rutas de defensa de *Arabidopsis*. JA: ácido jasmónico; ET: etileno; SA: ácido salicílico. Tomado y modificado de Feys & Parker (2000).

La resistencia inducida se puede lograr por la aplicación de diferentes agentes, entre ellos los hongos, cuyo uso está bien documentado (Punja y Utkhede, 2003). *Fusarium* representa un extenso género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo. La mayoría de las especies descritas pertenecientes a este género son saprófitas. *Fusarium oxysporum* incluye un significativo número de patógenos de plantas capaces de inducir necrosis o marchitez en cultivos de gran importancia económica (Olivain *et al.*, 2006). El uso de una cepa patógena en una planta que no es su huésped puede desencadenar resistencia inducida. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* es capaz de proteger el pimiento contra *Verticillium dahliae*, *Phytophthora capsici* y *Botrytis cinerea*, lo que sugiere que la respuesta inducida es tanto local como sistémica, así como no específica (Díaz *et al.*, 2005). Silvar *et al.* (2009) encontraron que *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* induce la expresión de varios genes PR implicados en la resistencia inducida en pimiento. Estos genes alcanzaron el máximo nivel de expresión en las hojas de las plantas inducidas, donde el patógeno *P. capsici* no fue detectado. Varios estudios han tratado de identificar los elicitores específicos que producen tales respuestas de defensa de la planta con el fin de evitar el uso del hongo vivo (Veloso & Díaz, 2013).

Por otra parte, el uso de cepas no patógenas de *F. oxysporum* constituye una buena estrategia de control biológico para proteger a la planta de una infección posterior con una cepa patógena capaz de provocar enfermedades vasculares (fusariosis) (Aimé *et al.*, 2008). La cepa no patógena *Fusarium oxysporum* 47 (Fo47), aislada de un suelo supresivo de la fusariosis, representa un agente de control biológico cuya eficacia se ha demostrado en varios tipos de plantas, entre ellas tomate y pimiento (Fravel *et al.*, 2003; Alabouvette *et al.*, 2009; Veloso & Díaz, 2012). Fo47 emplea varios mecanismos de acción para generar su capacidad de control biológico tales como la competencia por nutrientes en el suelo, la competencia por la colonización de la raíz, y la resistencia inducida (Olivain *et al.*, 2006). La inducción de proteínas PR tras la inducción con una cepa no patógena de *F. oxysporum* está bien documentada (Fuchs *et al.*, 1997; Recorbet *et al.*, 1998). Fuchs *et al.* (1997) vieron que la actividad de control

biológico de Fo47 era la responsable de inducir resistencia en tomate, correlacionándose con un aumento en la actividad de las enzimas quitinasa, β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucosidasa. Duijff *et al.* (1998) demostraron que Fo47 inducía un aumento en el número de proteínas PR en tomate.

En el presente trabajo se ha empleado un cultivo esterilizado de *F. oxysporum* Fo47 para determinar si confiere protección a plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) contra el patógeno *P. capsici*. Se discute la participación de mecanismos de resistencia inducida en la protección conferida a las plantas de judía por el cultivo de Fo47 y se analiza una enzima relacionada con la defensa de las plantas.

2. Objetivos

Los principales objetivos del presente trabajo consisten en comprobar si un cultivo esterilizado de Fo47 confiere resistencia contra *P. capsici* a plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y analizar la actividad β -1,3-glucanasa relacionada con la defensa de las plantas de judía.

3. Material y métodos

3.1. Material vegetal

Se han empleado plántulas de *Phaseolus vulgaris*. Para la obtención de las mismas, se sembraron semillas de esta especie (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Helda) en perlita y se regaron con solución nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950). Transcurridos 7 días en una cámara de cultivo a 25°C y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, se transplantaron a una mezcla de tierra y perlita (3:1, v/v), previamente esterilizada en el autoclave, y se regaron con agua. Las plantas se utilizaron para el tratamiento con el cultivo esterilizado de *Fusarium oxysporum* (Fo47) 3 días después del trasplante.

3.2. Método de tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47

Fusarium oxysporum Fo47 fue proporcionado por C. Alabouvette y C. Steinberg (UMR INRA, Dijon, Francia). El agente inductor se obtuvo a partir de cultivos de Fo47 en medio PDB (potato dextrose broth) incubados a 25°C en agitación (150 rpm) durante 7 días. Tras haber sido esterilizado en el autoclave, el cultivo se centrifugó a 6.000 rpm durante 20 minutos. El precipitado se resuspendió en 300 ml de agua destilada y se homogenizó con una batidora durante 5 minutos.

En cada experimento se estableció un grupo como tratamiento control y otro grupo como tratamiento con Fo47. Las hojas de las plantas control fueron pulverizadas con 10 ml de agua destilada. Las hojas de las plantas pertenecientes al tratamiento con Fo47 se pulverizaron con 10 ml de la preparación de Fo47.

3.3. Material patógeno

El aislado de *Phytophthora capsici* (Pc450) fue proporcionado por F. Panabieres (UMR INRA, Sophia-Antipolis, Francia). El inóculo se obtuvo a partir de cultivos en medio PDA (potato dextrose agar) incubados a 25°C durante 7 días. Se utilizaron discos del cultivo de 12 mm de diámetro como inóculo de las hojas de las plantas.

3.4. Bioensayo de severidad de la enfermedad con *Phytophthora capsici*

Se realizaron dos experimentos independientes en los que se emplearon grupos de 5 plantas por experimento y tratamiento. Después del tratamiento con Fo47 o agua destilada, las plantas se incubaron durante 24 horas en una cámara de cultivo a 25°C y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Posteriormente las plantas se inocularon depositando 2 discos del cultivo de Pc450 en cada hoja. Tras la inoculación las plantas se colocaron en una cámara húmeda a 25°C y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. La severidad de la enfermedad se anotó para cada hoja de acuerdo con una escala de 0 (sin lesión) a 4 (>75% del área con síntomas), 24, 48 y 72 horas después de la inoculación, y se midió el diámetro de cada lesión con un calibre digital. Los datos de severidad de las dos hojas se sumaron, dando un valor de entre 0 y 8 para cada planta. A partir de los valores de severidad se calculó el valor de AUDPC (Área bajo la curva de progreso de la enfermedad), según la fórmula siguiente (Fig. 8) (Campbell y Madden, 1990):

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Figura 8. Fórmula para el cálculo de AUDPC en la que y_i = índice de severidad en la observación i , t_i = días tras la inoculación en el momento de la observación i y n = nº de observaciones.

El valor de AUDPC combina los datos de severidad con el factor tiempo, ya que la aparición más o menos temprana de los síntomas refleja con más exactitud el grado de protección conseguido con el tratamiento.

Los datos de diámetro de lesión se utilizaron para calcular el área afectada en cada planta.

3.5. Toma de muestras y extracción de proteínas

Se realizaron tres experimentos independientes en los que se emplearon grupos de 6 plantas por experimento y tratamiento. Después del tratamiento con Fo47 o agua destilada, las plantas se incubaron durante 24 horas en una cámara de crecimiento a 25°C y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Tras las 24 horas se recogieron muestras de 3 hojas para el tratamiento control y para el tratamiento con Fo47. Las plantas restantes de cada tratamiento se inocularon añadiendo 2 discos del cultivo de Pc450 en cada hoja. Tras la inoculación se colocaron en una cámara húmeda a 25°C y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y se recogieron nuevas muestras 24 horas tras la

inoculación. Se anotó el peso fresco de todas las muestras y éstas se almacenaron en congelador (-40°C) hasta su análisis.

Para extraer las muestras, éstas se trituraron en un mortero con tampón Tris HCl 50mM + KCl 1M pH 7,5 + PVPP (polivinilpolipirrolidona). El PVPP se añadió aparte en una proporción de 50 miligramos por gramo de peso fresco, y a cada muestra se le añadió un volumen diferente de tampón en función del peso fresco de la misma. El extracto se filtró a través de una gasa y se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Las muestras se desalaron haciendo pasar 2,5 ml del sobrenadante resultante a través de columnas PD-10 (GE- Healthcare) previamente equilibradas con 25 ml de tampón Tris HCl 50mM pH 7,5 (Fig. 9). Posteriormente se recogieron las muestras desaladas en tres alícuotas de 1 ml cada una en tubos eppendorf que fueron congelados a -80°C.

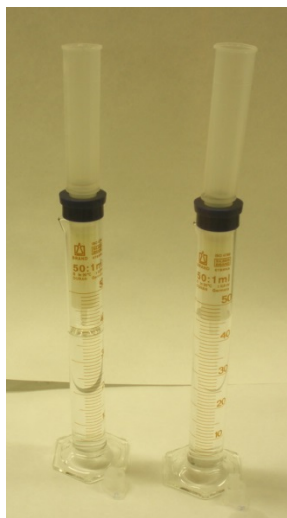


Figura 9. Columnas PD-10 equilibradas con 25ml de tampón Tris HCl 50mM pH 7,5.

3.6. Medida de proteínas totales

La medida de proteínas totales se llevó a cabo según el método de Stoscheck (1990). Este método consistió en mezclar 5 µl de muestra con 45µl de H₂O destilada, 50 µl de NaOH 1M y 900 µl de reactivo de Bradford. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos y posteriormente se midió su absorbancia a 590 nm.

3.7. Medida de la actividad β-1,3-glucanasa

La actividad β-1,3-glucanasa se midió usando laminarina como sustrato. Las medidas se realizaron siguiendo el método de Imanaka *et al.* (2001) con modificaciones. Una unidad de actividad β-1,3-glucanasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de azúcares reductores por minuto. El método utilizado consistió en preincubar la mezcla de reacción (332,5 µl de tampón acetato sódico 100mM pH 5 y 82,5 µl de laminarina al 1%) a 37°C durante 10 minutos y luego añadirle 85 µl de la muestra; posteriormente se incubó a 37°C durante 10 minutos. Los tubos se transfirieron a un baño de hielo durante 5 minutos y se les añadieron 670µl de Ferricianuro potásico 1,5mM en carbonato sódico 0,5M, incubándose a

100°C durante 15 minutos. Por último se transfirieron los tubos a un baño de hielo durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 420 nm.

3.8. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando STATGRAPHICS 5.1 para Windows. En el bioensayo con *P. capsici* los datos de área de infección y de AUPDC fueron analizados con la prueba t-Student. Para los datos de severidad se usó la prueba χ^2 de Pearson. En la medida de la actividad β -1,3-glucanasa se utilizó el test ANOVA con una prueba de rango múltiple mediante el método Duncan para conocer qué grupo o grupos son los que difieren de los demás.

4. Resultados

4.1. Tratamiento de Fo47 contra *Phytophthora capsici*

En las hojas no tratadas con Fo47 se vio como el área de infección de los dos discos del micelio de *P. capsici* se solapaba. Los resultados que mejor se observan son aquellos en los que transcurrieron 48 horas tras la inoculación de las hojas con el patógeno, por lo que se han utilizado dichos datos para determinar los diámetros. La comparación de las medias del área enferma por planta del tratamiento control y el tratamiento con Fo47 permite llegar a la conclusión de que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos (prueba t-Student, $p= 0,0002$) (Fig. 10). Como se esperaba, Fo47 no cambió el desarrollo normal de las plantas, ya que las plantas inducidas no diferían en tamaño de las plantas control.

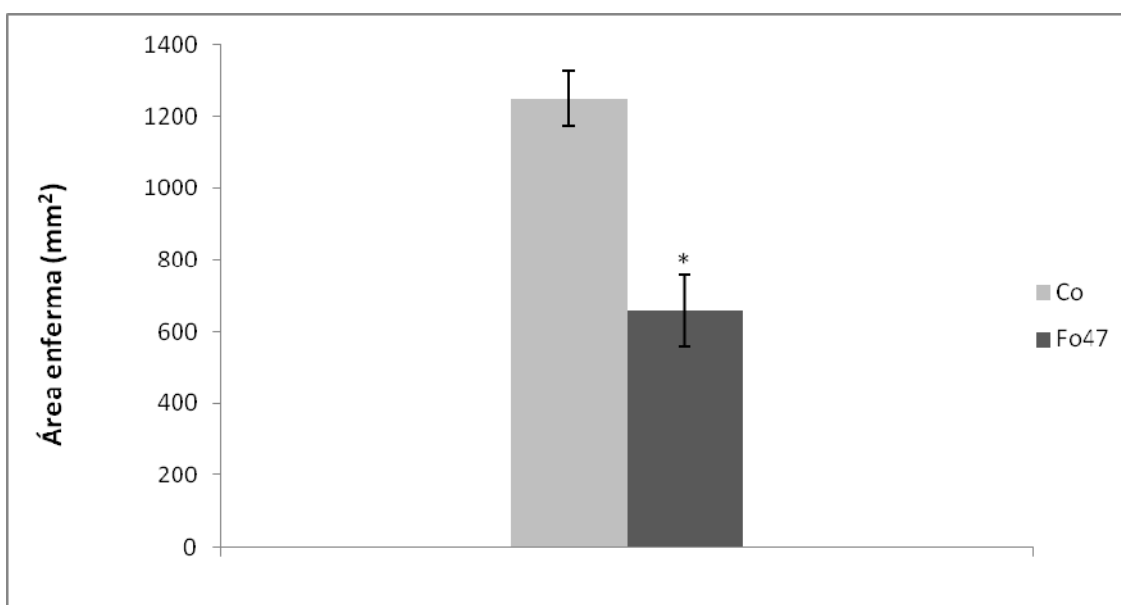


Figura 10. Área enferma por planta para cada tratamiento 48 horas después de la inoculación de las hojas de *P. vulgaris* con *P. capsici*. Los datos son medias \pm error estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la prueba t- Student.

Al comparar los datos de severidad de las plantas del tratamiento control y del tratamiento con Fo47 se concluyó que existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos (prueba χ^2 de Pearson, $p= 0,0300$) (Fig. 11). A cada planta de cada tratamiento se le asignó un valor de severidad de entre 0 y 8. Las plantas del tratamiento control mostraron valores de severidad de entre 2 y 4, mientras que las plantas tratadas con Fo47 mostraron valores de entre 0 y 3, por lo que hubo una reducción del valor de severidad en las plantas del tratamiento con Fo47. En ningún tratamiento se observaron plantas en las que la infección ocupara más del 50% de su superficie total 48 horas tras la inoculación, por lo que ninguna planta mostró valores de severidad excesivamente altos.

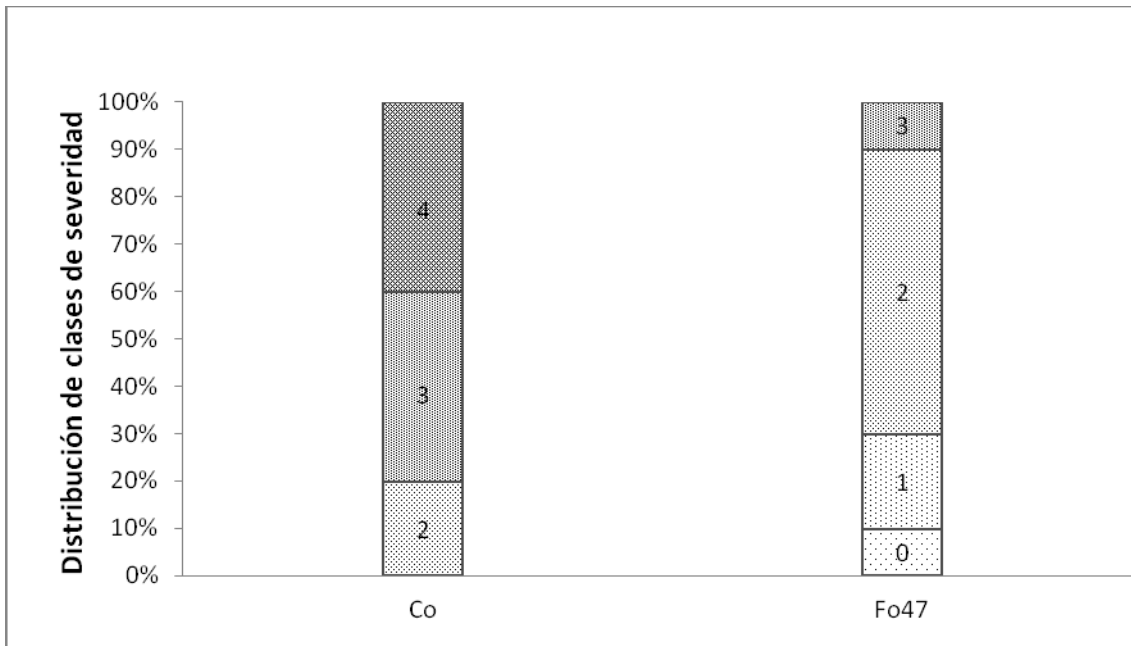


Figura 11. Severidad 48 horas tras la inoculación de las hojas de *P. vulgaris* con *P. capsici*. En la prueba χ^2 de Pearson se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Con respecto a los valores de AUDPC se compararon las medias de AUDPC de ambos tratamientos y se llegó a la conclusión de que existen diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento control y el tratamiento con Fo47 (prueba t- Student, $p= 0,0004$) (Fig. 12). Tal y como se observa en la figura 12, la AUDPC tiene un valor más bajo en el tratamiento con Fo47; la reducción del valor de AUDPC en las plantas tratadas con Fo47 junto con la reducción del área de infección y del valor severidad indican que Fo47 fue eficaz en el control de *P. capsici* en judía.

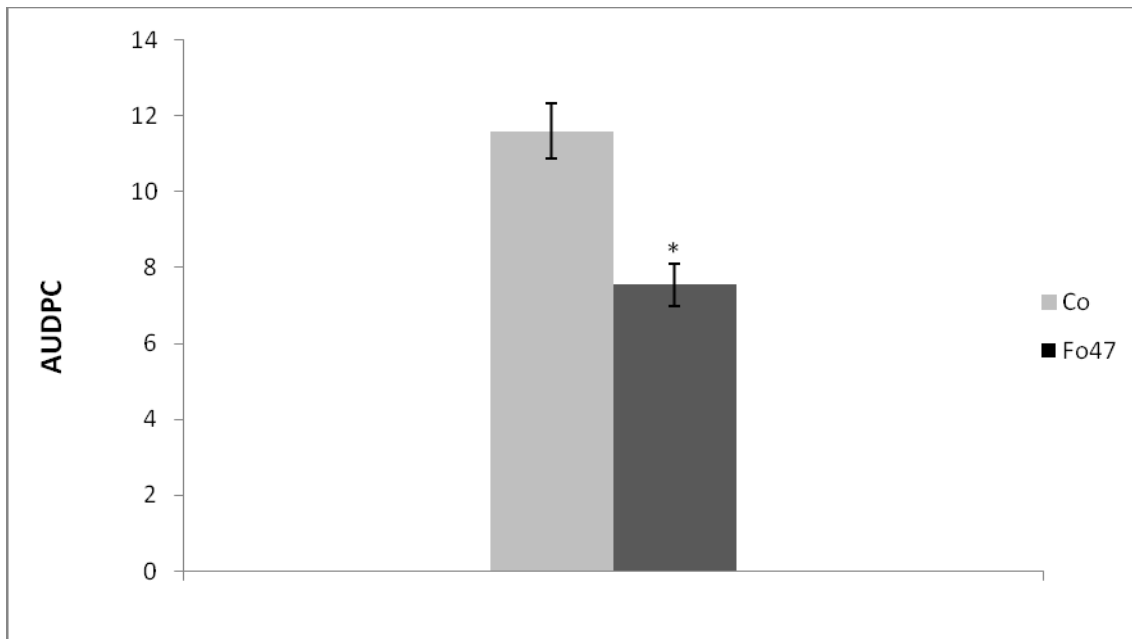


Figura 12. AUDPC en las plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *P. capsici*. Los datos son medias \pm error estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la prueba t- Student.

4.2. Efecto del tratamiento de Fo47 en la actividad β -1,3-glucanasa

Se comparó la actividad β -1,3-glucanasa de ambos tratamientos tanto a 0 horas como a 24 horas tras la inoculación con *P. capsici*, y se llegó a la conclusión de que existen diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento control y el tratamiento con Fo47 (test ANOVA, $p = 0,0070$) (Fig. 13). La prueba de Duncan permitió ver que de los cuatro grupos analizados (tratamiento control a 0 y 24 horas y tratamiento con Fo47 a 0 y 24 horas) el grupo de Fo47 a 24 horas es el que difiere de los demás, tal y como se observa en la figura 13. Esta observación representa un fenómeno de “priming”, de forma que las plantas tratadas con Fo47 muestran antes de la inoculación una actividad β -1,3-glucanasa similar a la de las plantas control, pero cuando se inocula el patógeno la actividad β -1,3-glucanasa es mucho mayor en las plantas del tratamiento con Fo47; la presencia del agente inductor Fo47 junto con la inoculación de *P. capsici* genera una respuesta mucho más fuerte, disparándose la expresión de β -1,3-glucanasas que protegen a las plantas de judía contra la infección por *P. capsici*.

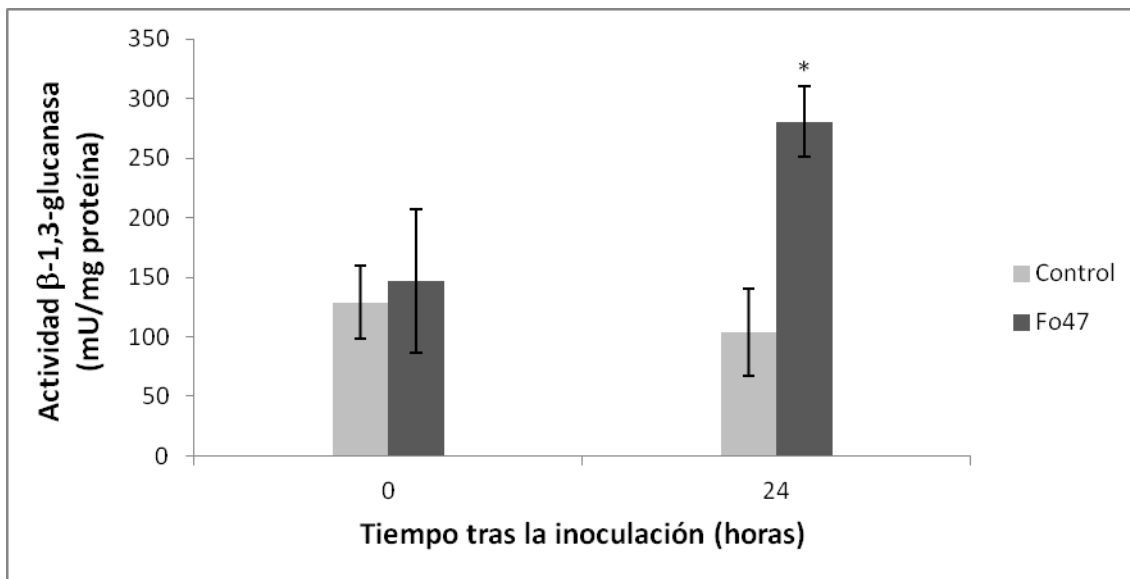


Figura 13. Actividad β -1,3-glucanasa (mU/mg proteína) para cada tratamiento 0 y 24 horas tras la inoculación con *P. capsici*. Los datos son medias \pm error estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los test ANOVA y Duncan.

5. Discusión

Fusarium oxysporum Fo47 ha demostrado ser un eficaz agente de biocontrol induciendo respuestas de defensa en varios cultivos (Fuchs *et al.*, 1997; Benhamou & Garand, 2001). Fo47 es capaz de colonizar las capas más externas de la raíz donde se desencadenan varias respuestas inducidas que previenen la colonización (Benhamou & Garand, 2001; Benhamou *et al.*, 2002; Alabouvette *et al.*, 2009).

Existen estudios en los que se ha comprobado la eficacia de Fo47 frente a diferentes patógenos. Veloso & Díaz (2012) comprobaron que la aplicación de Fo47 vivo redujo los síntomas de las enfermedades provocadas por *Verticillium dahliae* y *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento. Sin embargo, vieron que este agente no fue eficaz contra el patógeno *Botrytis cinerea*. Los resultados dependerán tanto de la especie de planta tratada como del patógeno empleado, además del agente que se utilice como inductor. En cualquier caso, hoy en día un programa de control integrado de enfermedades implica la disponibilidad de pesticidas, agentes de biocontrol y fitofortificantes; debido a sus notables propiedades biológicas, Fo47 ofrece muy buenas perspectivas para la gestión integrada de enfermedades radiculares en los cultivos de invernadero (Benhamou *et al.*, 2002).

Además de los hongos vivos, los extractos de *Fusarium* han sido ensayados con éxito frente a varias enfermedades de plantas, y la variedad de respuestas provocadas por las diferentes preparaciones crudas sugiere que hay varios elicitores presentes en el micelio de *Fusarium* y que cada uno desencadena una respuesta diferente en la planta (Veloso & Díaz, 2013). El uso de un extracto de cultivo esterilizado puede hacer más cómoda su aplicación, manteniendo parte de las propiedades inductoras de resistencia del hongo vivo. Veloso & Díaz (2013) demostraron que una fracción de un extracto crudo obtenido a partir de una cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* indujo resistencia en plantas de pimiento contra *Botrytis cinerea*,

pero no contra *Verticillium dahliae*. Sin embargo, Díaz *et al.* (2005) observaron que la misma cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* protegía a las plantas de pimiento contra ambos patógenos. La fracción insoluble del extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* contiene elicitors que protegen a las plantas de pimiento contra *B. cinerea* a través de la activación de genes de defensa, y esta respuesta difiere de la observada para el hongo vivo, que protege contra una gama más amplia de agentes patógenos y activa un patrón diferente de genes de defensa. Veloso & Díaz (2013) observaron la expresión del gen *CABPR1* (un tipo de PR-1) tras la inducción con el extracto de *Fusarium*. Las proteínas PR-1 son consideradas marcadores de la resistencia inducida. *CABPR1* se acumula de forma temprana cuando se trata de interacciones incompatibles, es decir, cuando se establece una relación entre un hospedante resistente y un patógeno avirulento, y en dicho estudio se expresó en la raíz, tallo y hojas de las plantas de pimiento.

En el presente estudio se observó la protección conferida por un cultivo esterilizado de Fo47 a plantas de judía frente a *P. capsici* y la inducción de “priming” de la actividad β -1,3-glucanasa en dichas plantas. Aimé *et al.* (2008) fueron los primeros en demostrar las similitudes entre las respuestas de defensa vegetales en tomate cuando se trataba con Fo47 y otros hongos de colonización de la raíz y en proponer que el mecanismo por el cual Fo47 protege a tomate involucra al fenómeno de “priming”. Los resultados mostraron que no hubo un aumento en la acumulación de proteínas PR tras la inoculación de la cepa protectora (Fo47), sino que ésta se produjo tras la inoculación del patógeno. En este ensayo de inducción de resistencia a *P. capsici* en judía con un cultivo esterilizado de Fo47 se puede ver que únicamente las plantas tratadas con Fo47 e inoculadas con *P. capsici* mostraron una subida considerable en la actividad β -1,3- glucanasa (“priming”), de forma que consiguieron una mayor protección contra el patógeno que las plantas control.

La riqueza de informes científicos acerca de las β -1,3-glucanasas vegetales nos ha permitido entender su estructura, su regulación de la expresión y la multitud de las funciones que desempeñan, directa e indirectamente en las plantas. Este grupo de proteínas se expresa también en las plantas para resistir el estrés abiótico. Las β -1,3-glucanasas vegetales están directamente involucradas en la defensa mediante la hidrólisis de las paredes celulares de hongos patógenos, comúnmente en combinación con las isoenzimas quitinasa, degradando juntas los β -1,3-glucanos y las quitinas de estos organismos (Balasubramanian *et al.*, 2012). Las plantas de judía tratadas con Fo47 e inoculadas con *P. capsici*, al presentar una mayor actividad β -1,3-glucanasa, consiguieron controlar en mayor medida al patógeno mediante la degradación del β -1,3-glucano de su pared celular, y esto se observó en la diferente magnitud de los síntomas en las plantas de cada tratamiento.

A pesar de que en la resistencia sistémica adquirida (SAR) también pueden observarse fenómenos de “priming”, los resultados de la β -1,3-glucanasa obtenidos en este estudio apuntan a que se puede tratar de un caso de resistencia sistémica inducida (ISR). En cualquier caso, sería necesario profundizar más en el estudio de los efectos sobre la fisiología de la planta y del agente inductor que hemos empleado.

6. Conclusiones-Conclusions

Tras la elaboración del presente trabajo se pudo concluir que el cultivo esterilizado de *F. oxysporum* Fo47 induce resistencia en judía contra *P. capsici*, y que las plantas de judía tratadas con dicho cultivo muestran una mayor actividad β -1,3-glucanasa solamente tras la inoculación con *P. capsici*, un fenómeno de “priming”.

In the present work it was concluded that the sterilized culture of F. oxysporum Fo47 induces resistance in bean against P. capsici, and bean plants treated with such a culture expressed an increase of β -1,3-glucanase activity only after inoculation with P. capsici, that is, a priming effect.

7. Referencias

Aimé S., Cordier C., Alabouvette C., Olivain C. (2008). Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **73**, 9-15.

Alabouvette C., Olivain C., Migheli Q., Steinberg C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *The New Phytologist*, **184**, 529-44.

Awade A., de Tapia M., Didierjean L., Burkard G.(1989). Biological function of bean pathogenesis related (PR3 and PR4) proteins. *Plant Science*, **63**, 121-130.

Balasubramanian V., Vashisht D., Cletus J., Sakthivel N. (2012). Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*, **34**, 1983-1990.

Bartual R., Marsal J.I., Carbonell E.A., Tello J.C., Campos T. (1991). Genética de la resistencia a *Phytophthora capsici* Leon. en pimiento. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, **17**, 3-124.

Baysal O., Turgut C., Mao G. (2005). Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. *Biologia Plantarum*, **49**, 599-604.

Benhamou N., Garand C. (2001). Cytological analysis of defense related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Phytopathology*, **91**, 730-40.

Benhamou N., Garand C., Goulet A. (2002). Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 4044-4060.

Bowers J.H., Papavizas G.C. Johnston S.A. (1990). Effect of soil temperature and soil-water matric potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. *Plant Disease*, **74**, 771-778.

Campbell C.L., Madden L.V.(1990). Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons, Nueva York.

Cavalier-Smith T.A. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **73**, 203-266.

Conrath U., Thulke O., Katz V., Schwindling S., Kohler A. (2001). Priming as mechanism in induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 113-119.

Cooke R.C., Whipps J.M. (1993). Ecophysiology of fungi. Blackwell. Oxford.

Cornell University. Phytophthora blight (*P. capsici*)
<http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html>.

da Rocha A.B., Hammerschmidt R. (2005). History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. *HortTechnology*, **15**, 518-529.

Díaz J., Silvar C., Varela M.M., Bernal A., Merino F. (2005). *Fusarium* confers protection against several mycelial pathogens of pepper plants. *Plant Pathology*, **54**, 773-780.

Duijff B.J., Pouhair D., Olivain C., Alabouvette C., Lemanceau P.(1998). Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology*, **104**, 903-910.

Diseases of Urban Plants, Phytophthora disease (P. capsici)
<http://ag.arizona.edu/pubs/diseases/az1124/#phyd>.

Erwin D.C., Ribeiro O.K. (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, Estados Unidos.

Feng B., Li P., Wang H., Zhang, X. (2010). Functional analysis of pcpme6 from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbial Pathogenesis*, **49**, 23-31.

Feys B.J., Parker J.E. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trend Genet*, **16**, 449-455.

Fravel D.R., Olivain C., Alabouvette C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *The New Phytologist*, **157**, 493-502.

Fuchs J.G., Moëgne-Loccoz Y., Défago G. (1997). Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to fusarium wilt in tomato. *Plant Disease*, **81**, 492-496.

García-Jiménez, J., Monte, E., Trapero, A. (2010). Los hongos y Oomicetos fitopatógenos. En: Jiménez Díaz R.M., Seguí E.M. eds, Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. SEF-Phytoma, Valencia, España, pp. 23-50.

García-Mas J., Arús P., Monfort A. (2004). Base molecular de la resistencia. En: Nuez F., Pérez de la Vega M., Carrillo J.M. eds, Resistencia genética a patógenos vegetales. Universidad Politécnica de Valencia, España, pp. 79-136.

Gevens A.J., Roberts P.D., McGovern R.J., Kucharek, T.A. (2008). Vegetable diseases caused by *Phytophthora capsici* in Florida. *Florida Cooperative Extension Service*, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Estados Unidos.

Goellner K., Conrath U. (2008). Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, **121**, 233-242.

Govindappa M., Lokesh S., Rai V.R., et al. (2010). Induction of systemic resistance and management of safflower *Macrophomina phaseolina* root rot disease by biocontrol agents. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, **43**, 26-40.

Gutiérrez G.C., de la Torre-Almaraz, R. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, **13**, 157-162.

Hammerschmidt R. (1999). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**, 77-84.

Hardham A.R. (1992). Cell biology of pathogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**, 491-526.

Hausbeck M.K., Lamour K.H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease*, **12**, 1292-1303.

Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C., Pegler D.N. (1995). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th ed. Wallingford, UK: CAB International.

Hoagland D.R., Arnon D.I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, **347**, 1-32.

Imanaka T., Fukui T., Fujiwara S. (2001). Chitinase from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Methods in Enzymology*, **330**, 319-329.

Jiménez-Díaz R.M., Zabalgoitia I. (2010). Infección y patogénesis en las micosis vegetales. En: Jiménez Díaz, R.M., Seguí E.M. eds, Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. SEF-Phytoma, Valencia, España, pp. 51-85.

Koç E., Üstün, A.S. (2012). Influence of *Phytophthora capsici* L. inoculation on disease severity, necrosis length, peroxidase and catalase activity, and phenolic content of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Turkish Journal of Biology*, **36**, 357-371.

Kuc J. (1982). Induced immunity to plant disease. *BioScience*, **32**, 854-860.

Lamour K.H., Hausbeck M.K. (2003). Effect of crop rotation on the survival of *Phytophthora capsici* and sensitivity to mefenoxam. *Plant Disease*, **87**, 841-845.

Lamour K.H., Stam R., Jupe J., Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, **13**, 329-337.

Leonian L.H. (1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology*, **12**, 401-408.

Li P., Feng B., Wang H., Tooley P.W., Zhang X. (2011). Isolation of nine *Phytophthora capsici* pectin methylesterase genes which are differentially expressed in various plant species. *Journal of Basic Microbiology*, **51**, 61-70.

Lyon G. (2007). Agents that can elicit induced resistance. En: Walters D., Newton A., Lyon G., eds, Induced Resistance for Plant Disease Control: a sustainable approach to crop protection. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido, pp. 9-29.

Nuez F., Pérez de la Vega M., Carrillo J.M. (2004). La resistencia genética a patógenos vegetales y la mejora vegetal. En: Nuez F., Pérez de la Vega M., Carrillo J.M. eds, Resistencia genética a patógenos vegetales. Universidad Politécnica de Valencia, España, pp. 5-38.

Ocampo C.H., Martín J.P., Sánchez-Yélamo M.D., Ortíz J.M., Toro O. (2005). Tracing the origin of Spanish common bean cultivars using biochemical and molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **52**, 33-40.

Olivain C., Humbert C., Nahalkova J., Fatehi J., L'Haridon F., Alabouvette C. (2006). Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains

inoculated together and separately into the soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 1523-1531.

Olmedilla-Alonso B., Pedrosa M.M., Cuadrado C., Brito M., Asensio-S-Manzanera C., Asensio-Vegas C. (2013). Composition of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris*), 'Almonga' and 'Curruquilla', and their postprandial effect in type 2 diabetics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93**, 1076-1082.

Pieterse C.M.J., van Loon L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends in Plant Science*, **4**, 52-58.

Ploetz R., Heine G., Haynes J.et al.(2005). An investigation of biological attributes that may contribute to the importance of *Phytophthora capsici* as a vegetable pathogen in Florida. *Annals of Applied Biology*, **140**, 61-67.

Pomar F., Bernal M.A., Collar J., Díaz J., Caramelo C., Gayoso C., Novo M., Prego C., Saavedra A., Silvar C., Merino F. (2001). A survey of "Tristeza" of pepper in Galicia and the fungal pathogens causing the disease. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, **20**, 90-93.

Punja Z.K., Utkhede R.S. (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, **21**, 400-7.

Recorbet G., Bestel-Corre G., Dumas-Gaudot E., Giaminazzi S., Alabouvette C. (1998). Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in tomato roots in response to colonization by either pathogenic or non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Microbiological Research*, **153**, 257-263.

Saikia R., Singh B.P., Kumar R., Arora D.K. (2005). Detection of pathogenesis related proteins chitinase and β -1,3 glucanase in induced chickpea. *Current Science*, **89**, 659-663.

Sánchez M.E., Fernández-Rebollo P., Trapero A. (2010). Podredumbre radical de la encina y el alcornoque. En: Jiménez Díaz R.M., Seguí E.M. eds, Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. SEF-Phytoma, Valencia, España, pp. 135-160.

San-Segundo B., Coca M.(2004). Genes de defensa. En: Nuez F., Pérez de la Vega M., Carrillo J.M.eds, Resistencia genética a patógenos vegetales. Universidad Politécnica de Valencia, España, pp 139-193.

Santalla M., Fueyo M.A., Rodino A.P., Montero I. (1999). Breeding for culinary and nutritional quality of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in intercropping systems with maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **3**, 225-229.

Silvar C., Merino F., Diaz J. (2009). Resistance in pepper plants induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* involves different defence-related genes. *Plant Biology*, **11**, 68-74.

Sticher L., Mauch-Mani B., Métraux J-P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **35**, 235-270.

Stoscheck C.M.(1990). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, **182**, 50-68.

Vallad G.E., Goodman R.M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, **44**, 1920-1934.

Van Loon, L.C. (1999). Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. En: Datta S.K., Muthukrishnan S. eds, Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press LLC, Boca Raton, 1-19.

Veloso J., Díaz J. (2012). *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defence genes. *Plant Pathology*, **61**, 281-288.

Veloso J., Díaz J. (2013). Induced resistance to *Botrytis cinerea* in *Capsicum annuum* by a *Fusarium* crude elicitor fraction, free of proteins. *Plant Biology*, **15**, 1040-1044.

Walters D.R., Ratsep J., Havis N.D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 1263-1280.