



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Ensayo de inducción de resistencia
a *Botrytis cinerea* en judía (*Phaseolus
vulgaris*) con un extracto de hinojo
(*Foeniculum vulgare*).

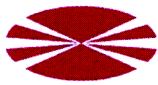


Trabajo de fin de grado

Curso 2013/2014

Grado en Biología

Carlota Rey Casal



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 *Botrytis cinerea* en judía (*Phaseolus vulgaris*) con un extracto de hinojo (*Foeniculum vulgare*)” presentado por Carlota Rey Casal para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña, a 16 de xuño de 2014

Asdo.: José Díaz Varela

Asdo.: Javier Veloso Freire

Índice

	Página
Resumen	1
1. Introducción.	2
1.1. Enfermedades de las plantas.	2
1.1.1. Comunicación molecular planta- patógeno.	2
1.1.2. Respuesta de la planta y tipos de patógeno según su estrategia de ataque.	3
1.1.3. Tipos de defensa de la planta.	4
1.2. Resistencia inducida. Generalidades.	6
1.2.1. Agentes inductores de resistencia.	7
1.2.2. Aplicación práctica de inductores	7
1.3. Agente inductor: <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	8
1.4. Patógeno: <i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr.	9
1.5. Huésped: <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	12
2. Objetivos.	13
3. Material y métodos.	13
3.1 Material vegetal.	13
3.1.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	13
3.1.2. <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	14
3.2. Material fúngico. <i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr.	14
3.3. Inducción de resistencia a <i>Botrytis cinerea</i> .	14
3.4. Inoculación y seguimiento de síntomas.	14
3.5. Toma de muestras.	15
3.6. Extracción de proteínas totales.	16
3.7. Medida de proteínas totales.	16
3.8. Medida de la actividad β -1,3 glucanasa.	16
3.9. Medida de la actividad peroxidasa.	17
3.10. Análisis estadístico.	17
4. Resultados.	18
4.1. Incidencia de la infección: Frecuencia de lesiones en expansión.	18
4.2. Severidad de la infección: Velocidad de crecimiento.	18
4.3. Actividad β -1,3 glucanasa.	19

4.4. Actividad peroxidasa.	19
5. Discusión.	21
6. Conclusiones.	23
7. Bibliografía.	23

Resumen

Las plantas se ven amenazadas continuamente por diversos organismos patógenos que provocan enfermedades, lo que conlleva a grandes pérdidas económicas a nivel global. El objetivo principal de este estudio es comprobar si un extracto de hoja de hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill.) induce resistencia en judía (*Phaseolus vulgaris* L.) ante la infección por el moho gris (*Botrytis cinerea* Pers: Fr.). Para ello se realizaron experimentos de medida de síntomas en tratamientos de judía con o sin extracto de hojas de hinojo congelado y fresco y posteriormente estudios de actividades enzimáticas β -1,3-glucanasa y peroxidasa relacionadas con la defensa de la planta huésped. Los resultados mostraron una disminución de los síntomas a nivel sistémico en hojas de plantas tratadas con hinojo congelado. La actividad β -1,3-glucanasa a nivel sistémico y con extracto de hinojo congelado disminuye respecto al control sin extracto congelado antes de la inoculación con *B. cinerea*, pero era mayor en las plantas tratadas con hinojo e inoculadas que en el control inoculado. La actividad peroxidasa mostró niveles semejantes en todos los tratamientos. Esto nos lleva a concluir que el extracto de hojas de hinojo congelado es un firme candidato a inductor de resistencia en judía ante *B. cinerea*.

1.- Introducción.

1.1.- Enfermedades de las plantas.

En la naturaleza, las plantas viven en entornos complejos, en los que se ven amenazadas continuamente por diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico. Dentro del estrés biótico, tienen que luchar contra plagas de herbívoros y enfermedades provocadas por una amplia gama de patógenos con los que interactúan íntimamente: bacterias, virus, hongos, nematodos y otras plantas (Pieterse *et al.*, 2009).

La mayoría de las plantas son resistentes ante muchos de los patógenos con los que se cruzan a lo largo de su vida. Estas interacciones son incompatibles y se denominan interacciones de no huésped. En cambio las interacciones con plantas susceptibles al ataque de un patógeno se denominan de huésped.

1.1.1.- Comunicación molecular planta- patógeno.

La comunicación molecular planta huésped-patógeno comienza casi inmediatamente después de que el patógeno establezca contacto con la superficie de la planta. El reconocimiento del patógeno es fundamental para la defensa de la planta (Mishra *et al.*, 2012). La planta reconoce moléculas propias del patógeno y activa a través de señales intercelulares mecanismos de defensa específicos contra el patógeno (Pieterse *et al.*, 2009).

En un primer contacto, la célula reconoce moléculas no específicas del patógeno, los PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) (Pieterse *et al.*, 2009). Están presentes en el exterior del patógeno, y generalmente tienen una función relacionada con la estructura del mismo (Smith *et al.*, 2010). Son moléculas que están a menudo altamente conservadas entre diferentes especies de patógenos. Algunos ejemplos de PAMPs son la flagelina de los cilios de las bacterias, la quitina y los glucanos de las paredes de los hongos, diferentes glucoproteínas y lipopolisacáridos...(Pieterse *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2012). Los PAMPs activan en la planta receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que a su vez inician diversos mecanismos de señalización que resultan en la activación de una resistencia basal, que no es fuerte pero sirve para frenar al patógeno, la inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI) (Pieterse *et al.*, 2009).

A lo largo de la evolución, patógeno y huésped han ido coevolucionando, en una carrera armamentística de ataque-defensa, en la que los patógenos han adquirido moléculas efectoras específicas que son transportadas a la célula huésped para suprimir la respuesta PTI y promover su virulencia, lo que resulta en la susceptibilidad de la planta. Tras este suceso, la planta ha evolucionado adquiriendo receptores específicos que reconocen los efectores del patógeno, que conlleva al desarrollo de un sistema de defensa mucho más fuerte y completo, la inmunidad desencadenada por efectores (ETI). Esta coevolución se ha explicado con el modelo en "zig zag" (Smith *et al.*, 2010). El resultado final de la batalla depende del equilibrio entre la capacidad del patógeno para suprimir la defensa y la de la planta para reconocer efectores que activan respuestas contundentes (Pieterse *et al.*, 2009).

1.1.2.- Respuesta de la planta y tipos de patógeno según su estrategia de ataque.

Ante el ataque de un patógeno, la planta provoca una respuesta hipersensible (HR), que tiene dos efectos: la muerte celular programada de un número de células adyacentes al lugar de infección y el aumento de expresión de genes de defensa (Díaz *et al.*, 2002). Para que sea posible este método de defensa es necesaria la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), moléculas implicadas en procesos de señalización que darán lugar a la activación de transcripción de genes relacionados con la defensa de la planta (Mishra, *et al.*, 2012). Además, la defensa de la planta está mediada por un conjunto de fitohormonas, que incluyen el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET). Generalmente el SA media la respuesta ante patógenos biotrofos, mientras JA y ET lo hacen ante necrotrofos (Spoel & Dong, 2008). Estos dos tipos de patógenos (Figura 1) se diferencian en su estrategia de ataque:

- Los necrotrofos provocan la muerte de tejidos de la planta. Se alimentan de materia muerta, por ello necesitan provocar la muerte de las células (producen gran cantidad de toxinas y de enzimas líticas que degradan la pared celular de las células de la planta huésped). Se caracterizan por tener un amplio rango de hospedadores; por ejemplo, el hongo del estudio que luego veremos más a fondo, *Botrytis cinerea*, puede infectar a más de 200 especies de plantas (Williamson *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2010).
- Los biotrofos crecen asociados a tejidos vivos de la planta, nutriéndose hasta que están listos para reproducirse. Los síntomas comienzan a observarse en un estado avanzado de

la infección. Su rango de huéspedes es estrecho (muchos sólo infectan a una especie de planta).

Existe un tercer grupo de patógenos intermedio (Figura 1), los hemibiotrofos, que tienen una primera fase de infección que muestra un comportamiento de biotrofo y una segunda como necrotrofo. El rango de huéspedes es intermedio (Pieterse *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010).

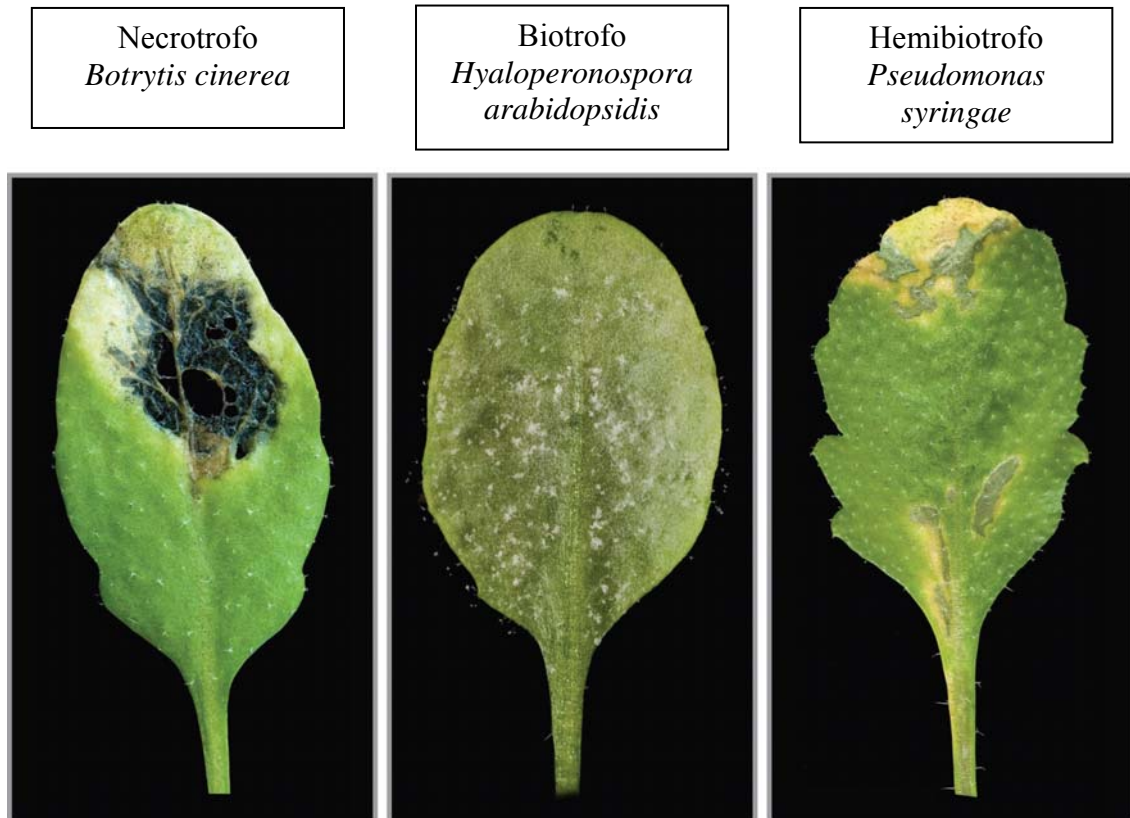


Figura 1. Síntomas de las enfermedades causadas por el hongo necrotrofo *Botrytis cinerea*, el oomiceto biotrofo *Hyaloperonospora arabidopsidis* y la bacteria hemibiotrofa *Pseudomonas syringae* en hojas de *Arabidopsis*. Tomada de Pieterse *et al.* (2009).

1.1.3.- Tipos de defensa de la planta.

La defensa de la planta puede ser de dos tipos principales (Figura 2): pasiva o activa (Lucas, 1998). La primera se encuentra presente constitutivamente, como es el caso de la superficie de la planta en sí misma, que constituye una barrera difícil de penetrar para los patógenos, o diferentes moléculas inhibidoras. La defensa activa se induce ante la presencia del patógeno, y pueden ser tanto depósitos de varias sustancias (lignina,

suberina, calosa...) en la pared celular que sirven de refuerzo, como la síntesis de moléculas de defensa.

Esta defensa también se puede dividir según la función que tenga (Figura 2):

- Defensa química: formada por moléculas inhibitoras del crecimiento del patógeno. Los exudados fungitóxicos de hojas de varias plantas como el tomate, los compuestos fenólicos o los taninos son ejemplos de defensa química pasiva contra *Botrytis* (Agrios, 2005). Las fitoalexinas o las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) forman parte de la defensa activa de la planta. Las proteínas PR se clasifican en varios grupos según la función patogénica que desempeñen (Lucas, 1998).

Se ha visto en varios estudios (Mauch & Staehelin, 1989; Ishida *et al.*, 2008; Salas & Zamora, 2009) un aumento de la actividad de enzimas como la β -1,3 glucanasa (que degrada el β -1,3 glucano de la pared de los hongos) o la peroxidasa en plantas resistentes comparadas con plantas susceptibles. Ambas son proteínas PR; las β -1,3 glucanasas pertenecen a la familia PR-2 y las peroxidosas a la PR-9 (Nuez *et al.*, 2004). En este estudio veremos si ha aumentado la actividad de estas dos enzimas.

- Defensa estructural: cutícula, pared celular, depósitos de lignina, suberina, calosa, etc. Las peroxidosas, además de ser proteínas PR, contribuyen a la formación de depósitos de lignina que refuerzan la pared celular vegetal (Lucas, 1998).

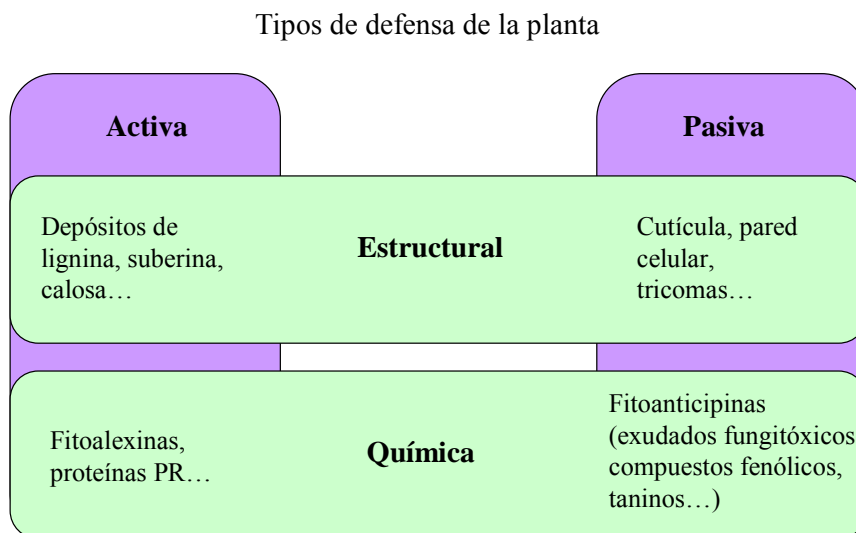


Figura 2. Tipos de defensa de la planta ante la presencia de un patógeno.

1.2.- Resistencia inducida. Generalidades.

Además de la defensa a nivel local, puede darse el caso de que la planta exprese una respuesta a nivel sistémico; esta defensa se denomina resistencia inducida (Van der Ent *et al.*, 2009). La resistencia inducida produce un aumento en la expresión de los mecanismos de defensa naturales de las plantas contra varios tipos de patógenos (Zeller, 2006).

En términos generales hay dos tipos de resistencia inducida bien caracterizados (Zeller, 2006; Van der Ent *et al.*, 2009):

- Resistencia sistémica adquirida (SAR). Un estímulo externo (presencia del patógeno o de diversas sustancias) en el primer contacto produce una respuesta hipersensible (HR) a nivel local. El aumento en la expresión de genes de resistencia puede ser transmitido a toda la planta a través del floema, lo que confiere resistencia a nivel sistémico (de toda la planta) ante un segundo ataque del patógeno. Los cambios epigenéticos producidos en la planta pueden ser también transmitidos a la progenie (Walters *et al.*, 2013), produciendo una nueva generación resistente. Algunos estudios indican que aparece una respuesta aún más fuerte en la progenie. Esto sugiere la posibilidad de producir plantas resistentes mediante exposición de plantas madre al estímulo. Todo este proceso de respuesta está mediado por un proceso dependiente de ácido salicílico (SA): la recepción de la señal por el huésped provoca un aumento significativo en la concentración de esta fitohormona en la planta a nivel local y sistémico. La SAR protege generalmente frente a biotrofos (Zeller, 2006; Van der Ent *et al.*, 2009).

- Resistencia sistémica inducida (ISR). En este caso la resistencia proviene de agentes inductores como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), entre otros, que ayudan a que la planta responda mejor. El proceso está mediado por dos fitohormonas: el jasmonato y el etileno. La ISR ofrece protección frente a una amplia gama de patógenos, generalmente necrotrofos y herbívoros generalistas (Zeller, 2006; Van der Ent *et al.*, 2009).

Se ha postulado que el SA induce resistencia a biotrofos y el JA, a necrotrofos y que ambos tienen una interacción negativa (Van der Ent *et al.*, 2009). La SAR dependiente de SA suprime la señalización de JA. De ser así, habría que tener cuidado a la hora de inducir un tipo de resistencia a un cultivo, ya que podríamos estar poniendo en peligro la planta al bajar las defensas ante el otro tipo de resistencia (Walters *et al.*, 2013). Por ejemplo, si en un cultivo utilizamos un inductor de resistencia ante un biotrofo, es

posible que estemos comprometiendo la respuesta ante herbívoros u hongos necrotrofos. Se requiere investigación para examinar este aspecto.

1.2.1. Agentes inductores de resistencia.

Los agentes inductores de resistencia pueden ser de dos tipos principales: químicos (Acibenzolar-S-metilo, ácido β -aminobutírico, probenazol, sacarina, fosfito, biochar...) y biológicos (hongos micorrícicos, extractos de algas...) (Walters *et al.*, 2013). A continuación mostramos un cuadro con ejemplos de inductores químicos y extractos de plantas (Tabla 1).

Tabla 1. Algunos ensayos de resistencia realizados con diferentes plantas, patógenos e inductores. Adaptado de Walters *et al.* (2013); Mosch *et al.* (1996) y Song *et al.* (2013),.

Inductor	Planta huésped	Patógeno	Referencia
Acibenzolar-S-metilo	pepino	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Du <i>et al.</i> (2011)
	haba	<i>Uromyces viciae-fabae</i>	Sillero <i>et al.</i> (2012)
	arroz	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Du <i>et al.</i> (2011)
Ácido β -aminobutírico	manzana	<i>Penicillium expansum</i>	Quaglia <i>et al.</i> (2011)
	guisante	<i>Uromyces pisi</i>	Barilli <i>et al.</i> (2010)
	lechuga	<i>Bremia lactucae</i>	Cohen <i>et al.</i> (2011)
Probenazol	maíz	<i>Bipolaris maydis</i>	Yang <i>et al.</i> (2011)
Sacarina	soja	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	Srivastava <i>et al.</i> (2011)
Tiamina	mijo perla	<i>Sclerospora graminicola</i>	Pushpalatha <i>et al.</i> (2011)
Extracto de muérdago	<i>Cotoneaster</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	Mosch <i>et al.</i> (1996)
Extracto de hiedra	<i>Cotoneaster</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	Mosch <i>et al.</i> (1996)
Capsicina, jaceosidina	tabaco	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Song <i>et al.</i> (2013)
	Arabidopsis	<i>Pseudomonas syringae</i>	Song <i>et al.</i> (2013)

1.2.2.- Aplicación práctica de inductores.

Se ha demostrado que, aunque el control de una enfermedad utilizando sólo inductores era inferior al obtenido con fungicidas, un uso de la combinación de ambos (con una cantidad reducida de fungicida) podría proporcionar mayores niveles de control de la enfermedad. La idea es la aplicación de inductor a principio de temporada, permitiendo un menor uso de fungicida más adelante (Walters *et al.*, 2013).

1.3.- Agente inductor: *Foeniculum vulgare* Mill.

En varios estudios se ha comprobado la actividad fungicida e inductora de muchos metabolitos secundarios procedentes de extractos de plantas frente a diferentes patógenos (Song *et al.*, 2013; Veloso *et al.*, 2014). La actividad fungicida resultaría en la disminución de síntomas a nivel local, ya que atacaría directamente al patógeno, mientras que la actividad inductora, objeto de esta investigación, resultaría en un aumento de resistencia a nivel sistémico.

Foeniculum vulgare Mill. (hinojo) es una planta de la familia Apiaceae (Umbelliferae) nativa de la región Mediterránea (Figura 3) que ha sido utilizada durante siglos en China y la zona del Mediterráneo como hierba aromática y como medicina popular (cura del reumatismo, dolencias de estómago...) debido a las propiedades farmacológicas de sus componentes químicos: actividad antioxidante y estrogénica, efecto hepatoprotector, antiespasmódico, anti-inflamatorio, etc. Además se utiliza en este campo como corrector del sabor de los medicamentos. Actualmente se sigue utilizando como aromatizante (debido a su olor característico a anís) en productos alimenticios tales como bebidas, pan, pastas, etc. También se utiliza como constituyente de productos cosméticos y farmacéuticos (Cantore *et al.*, 2004; He & Huang, 2011; Shahat *et al.*, 2011).



Figura 3. *Foeniculum vulgare* Mill. Fotografía tomada de <http://www.henriettes-herb.com/galleries/photos/f/fo/foeniculum-vulgare-7.html>

Son numerosos los estudios realizados en los últimos años sobre la composición química y actividad biológica del hinojo (García-Jiménez *et al.*, 2000; Cantore *et al.*, 2004; He & Huang, 2011; Shahat *et al.*, 2011; Diao, *et al.*, 2014). Se ha demostrado la actividad bactericida (Cantore *et al.*, 2004; Diao *et al.*, 2014) y fungicida (He & Huang, 2011; Shahat *et al.*, 2011; Aminifard & Mohammadi, 2013) de sus aceites esenciales. Las hojas de *F. vulgare* tienen una composición de metabolitos secundarios muy variada; casi el 100% de la composición de aceites esenciales son monoterpenos y arilpropanoides (siendo los primeros mucho más numerosos), ambos compuestos secundarios (Tabla 2) (García-Jiménez *et al.*, 2000).

Tabla 2. Composición porcentual (>2%) de hojas, tallos y semillas de hinojo recogidas en Aranjuez en diferentes fechas. Adaptado de García-Jiménez *et al.* (2000).

Fecha de recogida	16/04/1998	07/09/1997	07/09/1997	18/06/1998	26/09/1997	26/09/1997
Compuesto	Hoja 1	Tallo 1	Semilla 1	Hoja 2	Tallo 2	Semilla 2
α-pineno	7,4	9,7	3,2	6,6	14,4	3,2
β-pineno	1,6	6,7	0,6	2,3	5,3	1
mirreno	3,3	2,5	1,3	3	4,3	2,2
α-felandreno	9,4	24,3	2,4	27,2	31,4	7,8
p-cimeno	2,6	11,5	1,1	5,6	5,2	0,8
limoneno	25,3	11,6	7,3	18	15	7,2
fenchona	19,4	9,1	22,2	18,3	17,5	34,4
metil chavicol	12,3	1,5	2,9	12,1		1,2
(E)-anetol	10,9	17,4	54,9	4,5	3,3	38,1
Total monoterpenos	71,2	79,5	41,6	83	96,1	60,6
Total arilpropanoides	23,4	19	57,8	16,8	3,3	39,3

Los motivos principales por los que hemos escogido esta planta como agente inductor fueron los siguientes:

- Es una planta silvestre muy común y fácil de encontrar.
- Tiene propiedades farmacológicas en el campo de la medicina, y propiedades antimicrobianas.
- Su variada composición de metabolitos secundarios, muchos de los cuales son potenciales inductores de resistencia.

1.4.- Patógeno: *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.

Botrytis cinerea Pers.:Fr., conocido comúnmente como moho gris, es una especie de hongo que ataca a un elevado número de fanerógamas en todo el mundo (Figura 4). Su

plasticidad genética provoca que muchas clases de fungicidas hayan fracasado. Esta especie se ha convertido en un modelo de hongo necrotrofo. Es un patógeno difícil de controlar por tener un gran número de huéspedes, varios mecanismos de ataque, y poder sobrevivir durante períodos prolongados en estado quiescente (Williamson *et al.*, 2007).

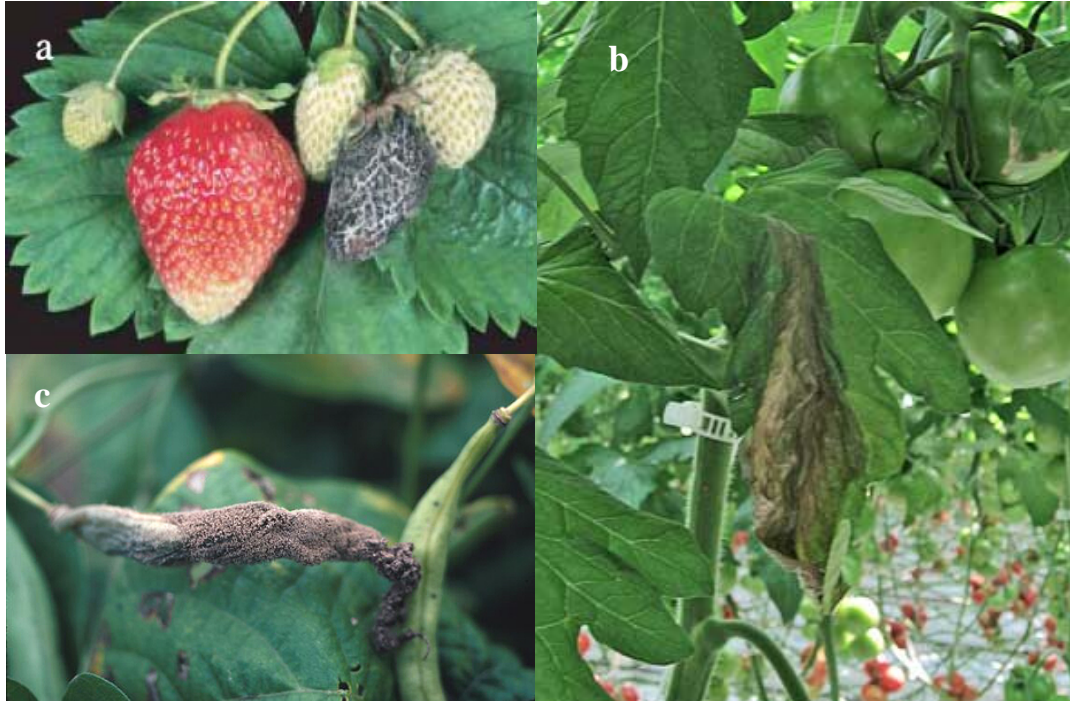


Figura 4. Síntomas causados por *B. cinerea* en a) fresa, b) hoja de tomate, c) fruto de judía. Tomadas de: a) Williamson *et al.*, 2007.; b) <http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/botrytis.htm>; c) <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/snapbean/>

B. cinerea llega a la superficie de una hoja como espora y debe penetrarla, pero se topa con varias barreras físicas: ceras, tricomas, pared celular, etc. (van Kan, 2006).

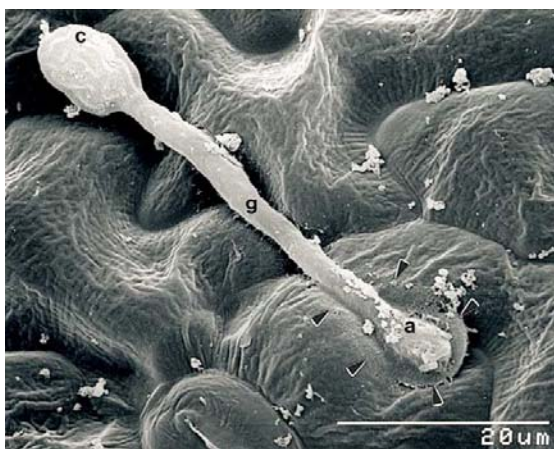


Figura 5. Germinación y desarrollo de un apresorio en la superficie de una hoja de tomate. c: conidio; g: tubo germinativo; a: apresorio. Las puntas de flecha indican la delimitación de un área alrededor del lugar de contacto donde la superficie epidérmica parece estar modificada, posiblemente por polisacáridos que cubren el apresorio. Los restos de estos polisacáridos permanecen visibles en forma de copos blancos. Tomado de van Kan (2006).

Para superar estas barreras debe romperlas por fuerza mecánica o degradación enzimática. Posteriormente se forma el tubo de germinación y una estructura abultada, el apresorio (Figura 5). Al formarse éste, baja el potencial osmótico y entra agua (van Kan, 2006). La presión del agua hace que surja la clavija de penetración que rompe la hoja, debido a una gran fuerza mecánica en un espacio pequeño. Esta rotura se ve facilitada por la acción de enzimas degradativas de pared celular secretadas desde el apresorio que debilitan *a priori* las paredes. El ápice de la clavija de penetración genera peróxido de oxígeno (H₂O₂); esto acciona una explosión oxidativa en el tejido enfermo, que conduce a la alteración del estado *redox* en y alrededor del tejido, propiciando el progreso de la lesión (van Kan, 2006).

Tras la penetración en el huésped, se produce la muerte del tejido adyacente y la formación de una lesión primaria, seguidos de la expansión de la lesión y maceración del tejido de la planta (van Kan, 2006) (Figura 6). Los síntomas que provoca en las plantas son la pudrición blanda de las partes aéreas, seguida de una rápida aparición de masas grises de conidios y la descomposición de frutas, flores, hojas, brotes y órganos de almacenamiento del suelo (Williamson *et al.*, 2007).

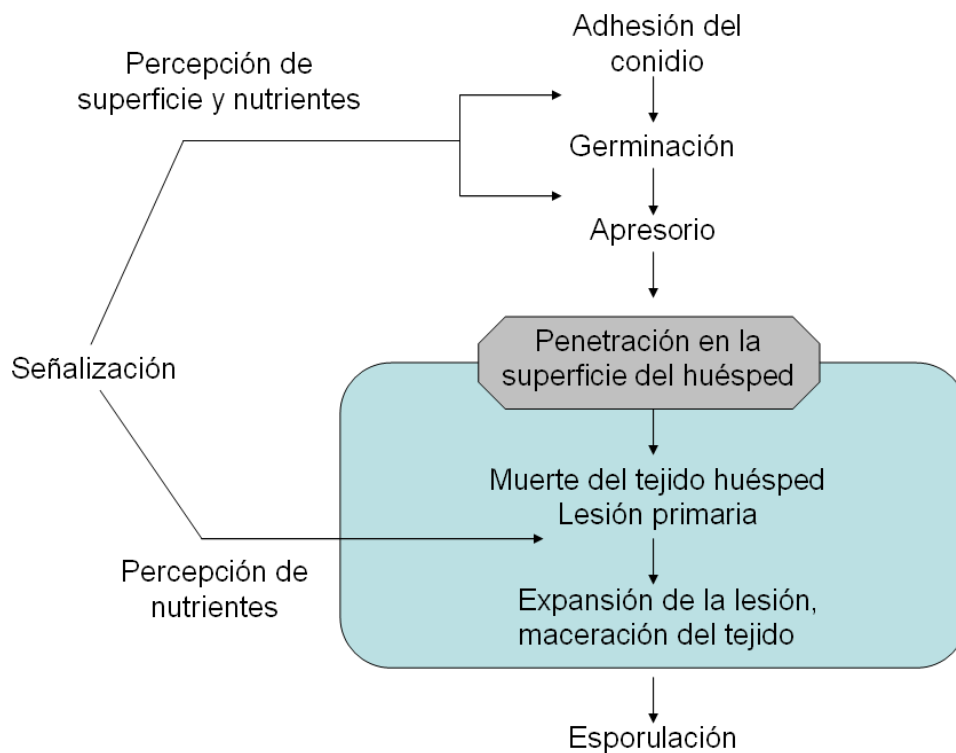


Figura 6. Etapas de desarrollo y fisiológicas que ocurren durante la infección por *B. cinerea* en las plantas. Adaptada de van Kan (2006).

Una característica de las especies de plantas hospedadoras de *B. cinerea* es el alto contenido en pectina de la pared celular. Las especies con bajos contenidos en pectinas son huéspedes malos para *Botrytis*. Se entiende entonces que el moho gris cuenta con una maquinaria pectinolítica efectiva (van Kan, 2006).

La amplia gama de huéspedes a los que ataca *B. cinerea* se basa en su capacidad para contrarrestar la acción tóxica de muchos metabolitos que producen las plantas, por ejemplo, detoxificándolos o secretándolos (van Kan, 2006).

La infección que produce el moho gris se ve agravada por la alta humedad, la luz reducida y temperaturas moderadas. La humedad relativa alta permite la germinación y penetración en el huésped. El uso excesivo de fertilizantes nitrogenados fomenta un rápido crecimiento vegetativo y aumenta el riesgo de infección (Williamson *et al.*, 2007).

Es más destructivo en tejidos maduros o senescentes, pero generalmente penetra en la planta en una etapa mucho más temprana del desarrollo y se mantiene en reposo hasta que las condiciones ambientales son propicias y el huésped cambia su fisiología. Aunque no siempre esto es así; *B. cinerea* también causa pérdidas en cultivos antes de la cosecha o incluso en la etapa de plántula. Con el aumento internacional del comercio de productos almacenados a bajas temperaturas este hongo ha alcanzado gran importancia, ya que puede crecer con eficacia durante largos períodos justo por encima de las temperaturas de congelación en productos como el kiwi, las manzanas o las peras. Del mismo modo, el importante comercio de flores de corte se ve afectado negativamente; la rosa y la gerbera son particularmente propensas a sufrir daños. Debido a esto, hay cuantiosas pérdidas de cosechas cuando los cultivos aparentemente sanos se transportan a los mercados (Williamson *et al.*, 2007).

Los motivos de la elección para este trabajo son:

- Es un modelo de hongo de estrategia necrotrofa.
- Tiene gran importancia económica.
- Tiene un amplio rango de hospedadores: hay más de 200 spp. de plantas que pueden verse infectadas por el moho gris, entre ellas, *Phaseolus vulgaris* L., la judía.

1.5.- Huésped: *Phaseolus vulgaris* L.

Phaseolus vulgaris L., conocida comúnmente como judía, es una fabácea anual con un ciclo de vida relativamente corto. Actualmente está domesticada; evolucionó desde una forma salvaje procedente del continente americano (Díaz Leal, 2012).

Los motivos por los cuales se escogió esta especie son:

- Es una planta cultivada con interés económico.
- Crece en pocos días y se infecta fácilmente con *Botrytis cinerea*.

2.- Objetivos.

- Comprobar si un extracto de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill. (hinojo) induce resistencia en *Phaseolus vulgaris* L. (judía) frente a la infección por *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (moho gris).
- Determinar si la aplicación del extracto de hojas de hinojo en hojas de judía aumenta las actividades enzimáticas de β -1,3 glucanasa y peroxidasa relacionadas con la defensa de la planta a nivel sistémico.

3.- Material y métodos.

3.1.- Material vegetal.

En este trabajo hemos utilizado dos especies de plantas fanerógamas: *Phaseolus vulgaris* L. (judía) y *Foeniculum vulgare* Mill. (hinojo silvestre).

3.1.1.- *Phaseolus vulgaris* L.

Se sembraron semillas comerciales de judía (cultivar Helda) usando perlita como sustrato. El sustrato se regó con solución nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950). Las semillas así sembradas se incubaron en una cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 h de luz a 25°C y 8 h de oscuridad a 18°C.

Pasada una semana tras la siembra se transplantaron las plantas con mejor aspecto a pequeñas macetas individuales con una mezcla 1:2 (v:v) de perlita con tierra vegetal,

respectivamente. Las plantas se regaron con agua y se incubaron en cámara con las condiciones indicadas más arriba durante tres días.

3.1.2.- *Foeniculum vulgare* Mill.

Para inducir la resistencia se utilizaron hojas de hinojo silvestre procedente del campus de Elviña (A Coruña) recogidas en primavera. En el primer experimento se recolectaron las hojas y se congelaron a -40°C en bolsas de 2,5g varios días previos a la inducción, utilizándose este mismo hinojo congelado para todos los experimentos. Además, para cada uno de los experimentos se recolectaron hojas frescas el mismo día que se indujeron las plantas.

3.2.- Material fúngico. *Botrytis cinerea* Pers: Fr.

Con la función de infectar a la planta se ha utilizado el aislado B0510 de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., cedido por el Dr. van Kan (Wageningen University, Países Bajos). El hongo se cultivó en medio PDA (patata dextrosa agar) durante 5 días en una cámara a 23 °C en oscuridad permanente.

3.3.- Inducción de resistencia a *Botrytis cinerea*.

Para la inducción se homogenizaron 2,5g de hinojo en 10 ml de etanol absoluto. Se filtró el extracto con ayuda de una gasa. De este filtrado se cogió 1 ml y se diluyó en 50 ml de agua destilada. Para el control se preparó una dilución de 1 ml de etanol en 50 ml de agua destilada. Se realizó todo de la misma forma con *F. vulgare* congelado y con *F. vulgare* fresco.

Una vez preparados los extractos, se pulverizaron 5 ml del extracto diluido en una de las dos hojas de cada planta para ver el efecto local (en la que no se pulverizó se verá el efecto a nivel sistémico).

3.4.- Inoculación y seguimiento de síntomas.

Pasadas 24 h tras la inducción, las plantas se inocularon con discos de micelio en crecimiento de las placas de cultivo de *B. cinerea* que se cortaron con ayuda de un

sacabocados de 9 mm de diámetro. Con ayuda de una lanceta se pegaron en el haz de cada hoja de judía dos discos de micelio, separados a una distancia considerable para evitar que los bordes de las lesiones se unieran y no se pudiera delimitar su diámetro. Tras esto se incubaron las plantas de cada tratamiento a temperatura ambiente en una caja grande con una capa de aproximadamente 1 cm de agua y unos papeles que sobresalían del agua (Figura 7) para mantener una humedad elevada en el aire y así facilitar la infección por *B. cinerea*.



Figura 7. Incubación en cubetas.

Pasadas 24, 48 y 72h horas tras la inoculación se observó el estado de las hojas y se midió el diámetro de las lesiones. Se calculó la tasa de crecimiento de cada lesión con la resta del diámetro a 72 h menos el diámetro a 48 h.

Se realizaron dos experimentos independientes con 6 plantas por tratamiento en cada uno de ellos.

3.5.- Toma de muestras.

Tras realizar dos experimentos de evaluación de los síntomas de *B. cinerea* en judía, se llevaron a cabo experimentos para comprobar si había diferencias en actividades enzimáticas relacionadas con la defensa de la planta ante el patógeno: actividad peroxidasa y β -1-3-glucanasa.

Para recoger las muestras, se realizaron tres experimentos independientes con la misma metodología que en los anteriores, pero a las 24 h tras la inoculación se pesaron

conjuntamente las hojas sistémicas de cada tratamiento y se congelaron. Los tratamientos fueron los siguientes: plantas control no inoculadas, plantas control inoculadas con *B. cinerea*, plantas tratadas con *F. vulgare* congelado y no inoculadas y plantas tratadas con *F. vulgare* congelado e inoculadas.

3.6.- Extracción de proteínas totales.

Se homogenizó en frío cada muestra de hojas congeladas en un mortero con 5 ml de tampón Tris HCl 50 mM + KCl 1M pH 7,5 y 200 mg de PVPP (polivinilpolipirrolidona). Se filtró el líquido obtenido a través de una gasa. El filtrado se centrifugó a 4°C y 12857 xg durante 20 min. Se midió el volumen del sobrenadante obtenido y se pasaron 2,5 ml de éste a través de una columna PD-10 (GE- Healthcare) que fue previamente lavada con 25 ml de tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5. Una vez entraron los 2,5 ml de muestra en la columna, se añadieron a la columna 3.5 ml de tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5 y se recogió el eluido. Los 3,5 ml recogidos en el tubo se usaron como muestra y se separaron en 3 alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se congelaron a -80°C.

3.7.- Medida de proteínas totales.

Se centrifugaron las muestras durante un minuto a 16060 xg y se usó el sobrenadante para las medidas. Se utilizó la metodología de Stoscheck (1990). Se mezclaron 900 µl de reactivo de Bradford, 50 µl de NaOH 1M, 47,5 µl de H₂O y 2,5 µl de muestra (alícuotas de la extracción). Se incubó la mezcla 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se midió la absorbancia a 590 nm frente a un blanco en el que se sustituyó la muestra por agua destilada. Los valores de absorbancia obtenidos se sustituyeron en la función de una recta de calibrado para calcular la concentración de proteína en la muestra.

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

La medida se realiza mediante una modificación del método de Imanaka *et al.* 2001, utilizando laminarina como sustrato. Una unidad internacional (U) de actividad de β-1,3 glucanasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de producto por minuto.

Se centrifugaron las muestras durante un minuto a 16060 xg y se usó el sobrenadante para las medidas. Se preincubó la mezcla de reacción (332,5 µl de tampón acetato sódico 100 mM pH 5 y 82,5 µl de laminarina al 1%, (L9634-1g, Sigma) a 37°C. Tras descongelar una alícuota de cada muestra se añadieron 85 µl a la mezcla de reacción y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Se transfirieron los tubos a un baño de hielo durante 5 minutos. Se añadieron 670 µl de Ferricianuro potásico 1,5 mM en carbonato sódico 0,5 M y se incubó en agua hirviendo durante 15 minutos. Se transfirieron los tubos a un baño de hielo durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 420 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se sustituyeron en la función de una recta de calibrado realizada con glucosa, para calcular la actividad β-1,3 glucanasa en la muestra. Los datos se expresaron en mU/mg proteína.

3.9.- Medida de la actividad peroxidasa.

Se centrifugaron las muestras durante un minuto a 16060 xg y se usó el sobrenadante para las medidas; al mismo tiempo se puso un tubo de ensayo con tampón Tris HCl 50 mM pH 7.5 en un baño a 25°C. Se mezclaron 890 µl de tampón Tris HCl 50 mM pH 7.5, 10 µl de 4MN (4-metoxinaftol) 100 mM, 50 µl de H₂O₂ 10 mM y 50 µl de muestra. Se midió el incremento de absorbancia durante tres minutos a 593 nm. Los valores obtenidos se utilizaron para calcular la actividad peroxidasa en la muestra, utilizando un $\epsilon_{593} = 21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los datos se expresaron en mU/mg proteína.

3.10.- Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos de este trabajo han sido realizados con el programa Statgraphics 5.1. Para medir la incidencia de la infección se ha realizado una prueba χ^2 de Pearson ($\alpha=0,05$) con el número de lesiones expandidas y no expandidas de cada tratamiento. Como medida de severidad se ha utilizado la velocidad de crecimiento de la infección y se han analizado los datos obtenidos con un test Anova de una vía y un test de Duncan ($\alpha=0,05$). Para realizar los análisis de la actividad β-1,3 glucanasa y peroxidasa se ha utilizado la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$) seguida de la opción de análisis del gráfico de "cajas y bigotes".

4.- Resultados.

4.1.- Incidencia de la infección: Frecuencia de lesiones en expansión.

La incidencia es una forma de medida de la frecuencia de desarrollo de la enfermedad. Para medirla se ha utilizado la frecuencia de lesiones en expansión, es decir, la proporción de discos de micelio de *B.cinerea* colocados sobre el haz de las hojas de judía que han conseguido infectar a la planta (%LE) frente a la proporción de los que no lo han hecho (%LNE).

Tanto a nivel local como a nivel sistémico no se observan diferencias ($p < 0,05$) en ninguno de los tratamientos tras realizar pruebas de χ^2 de Pearson (Figura 8).

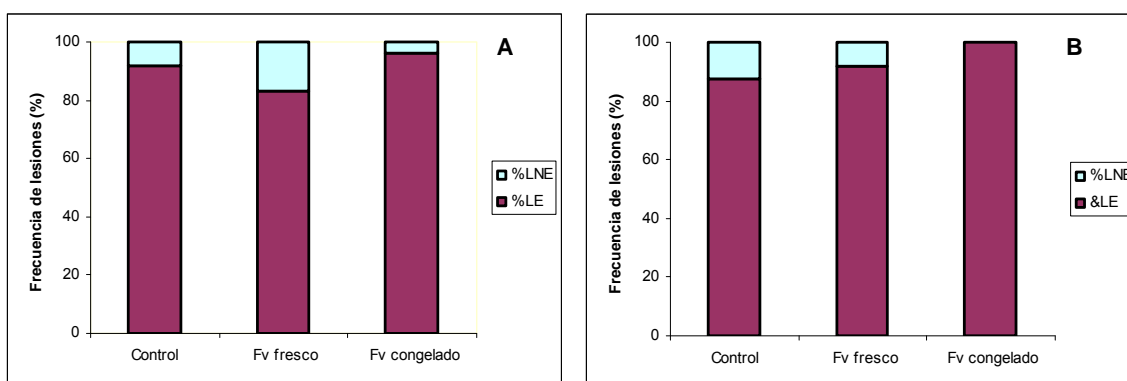


Figura 8. Incidencia de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* 72 h tras la inoculación en hojas de judía en diferentes tratamientos: Control (hojas de judía sin extracto de *Foeniculum vulgare*), Fv fresco (hojas de judía con extracto de *Foeniculum vulgare* fresco) y Fv congelado (hojas de judía con extracto de *Foeniculum vulgare* congelado). %LE: porcentaje de lesiones expandidas y %LNE: porcentaje de lesiones no expandidas. A) Nivel local. B) Nivel sistémico.

4.2.- Severidad de la infección: Velocidad de crecimiento.

La severidad de la infección es una medida de la intensidad de ataque del patógeno en el hospedador. Para tener una medición de la severidad de la enfermedad se utiliza la velocidad de crecimiento de la infección, que es el aumento de diámetro de infección por día. A nivel local (Figura 9 A), se observa una velocidad de crecimiento igual en los tres tratamientos, probándolo con un test de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). A nivel sistémico (Figura 9 B), se observa que el tratamiento con un extracto de hojas de *F. vulgare*

congelado tiene una menor velocidad de crecimiento de infección que el control y el tratamiento con un extracto de hojas de *F. vulgare* fresco ($p < 0,05$).

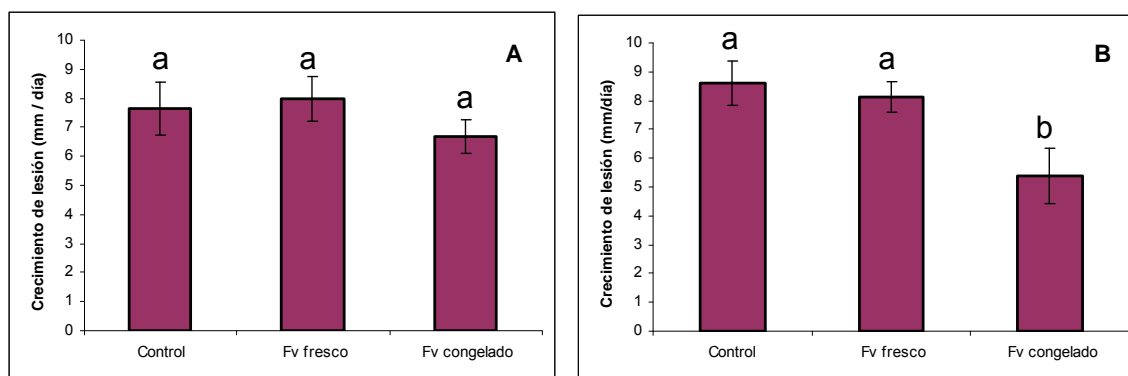


Figura 9. Efecto de *Foeniculum vulgare* sobre la velocidad de crecimiento del diámetro de lesión causada por *B. cinerea* en hojas de judía. Control (hojas de judía sin extracto de *Foeniculum vulgare*), Fv fresco (hojas de judía con extracto de *Foeniculum vulgare* fresco) y Fv congelado (hojas de judía con extracto de *Foeniculum vulgare* congelado). A) Nivel local. B) Nivel sistémico. Las letras diferentes indican diferencias significativas en un test de Duncan ($p < 0,05$).

A partir de estos resultados, se decidió estudiar las actividades enzimáticas de β -1,3 glucanasa y peroxidasa sólo a nivel sistémico.

4.3.- Actividad β -1,3 glucanasa.

La actividad β -1,3 glucanasa mostró niveles significativamente menores ($p < 0,05$) en el Control tratado con *Foeniculum vulgare* congelado frente al Control no tratado con *Foeniculum vulgare* congelado (Figura 10). Además, existe un aumento significativo de actividad de esta enzima en hojas de judía con extracto de hinojo 24 h tras la inoculación con *B. cinerea* frente a hojas inoculadas y sin extracto. Los niveles de actividad β -1,3 glucanasa se mantienen iguales entre las plantas tratadas con extracto de *F. vulgare* congelado inoculadas y no inoculadas con el hongo.

4.4.- Actividad peroxidasa.

La actividad peroxidasa mostró niveles semejantes en los diferentes tratamientos (Figura 11). La prueba Kruskal-Wallis realizada con los datos de actividad peroxidasa obtenidos resultó en un p-valor de 0,368504, con un nivel de confianza del 95%.

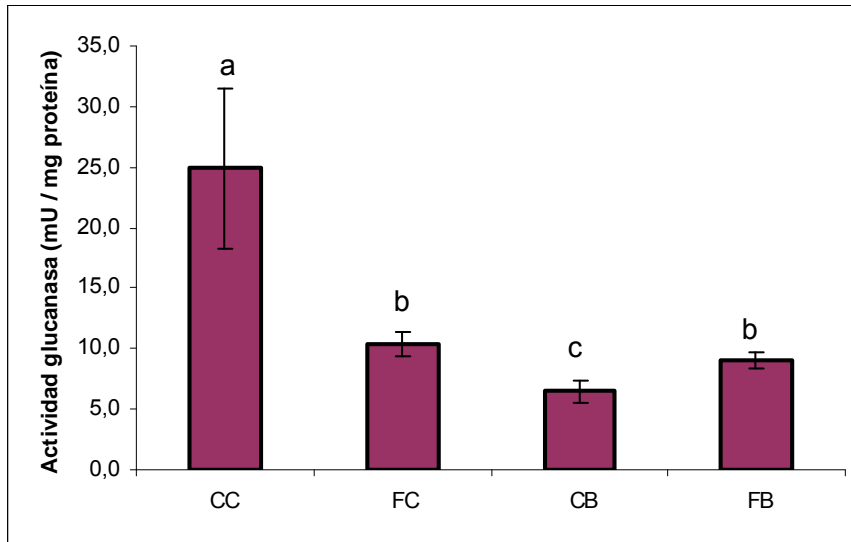


Figura 10. Actividad β -1,3 glucanasa a nivel sistémico que mostraron los diferentes tratamientos en los experimentos realizados. CC: hojas de judía control sin inocular con *B. cinerea*; FC: hojas de judía con extracto de hinojo 24 h tras la inoculación con *B. cinerea*; CB: hojas de judía control 24 h tras la inoculación con *B. cinerea*; FB: hojas de judía con extracto de hinojo 24 h tras la inoculación con *B. cinerea*. Las letras diferentes indican diferencias significativas en un test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) seguido de un análisis del gráfico de "cajas y bigotes".

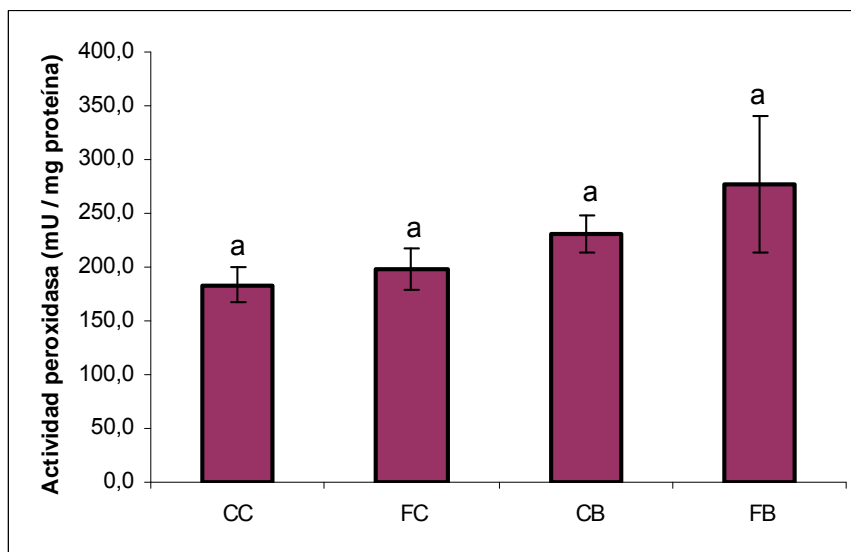


Figura 11. Actividad peroxidasa a nivel sistémico que mostraron los diferentes tratamientos en los experimentos realizados. CC: hojas de judía control sin inocular con *B. cinerea*; FC: hojas de judía con extracto de hinojo 24 h tras la inoculación con *B. cinerea*; CB: hojas de judía control 24 h tras la inoculación con *B. cinerea*; FB: hojas de judía con extracto de hinojo 24 h tras la inoculación con *B. cinerea*.

5.- Discusión.

Los resultados mostraron que la aplicación de un extracto de hinojo no conduce a una disminución en la incidencia de la enfermedad en la planta, es decir, no afecta a la probabilidad de que la planta enferme. Estos resultados de incidencia expresados en porcentaje de lesiones en expansión indican que la resistencia que induce el extracto de hinojo no es completa, apoyando la idea de que la resistencia inducida debe utilizarse en aplicación práctica junto a otros métodos (Walters *et al.*, 2013).

En cambio, la aplicación del extracto sí que disminuyó la severidad de la enfermedad, pero tan sólo a nivel sistémico y con hinojo congelado. La inducción de resistencia produce un aumento de la defensa a nivel de toda la planta, luego sería en principio algo incongruente con los resultados obtenidos. A nivel local, que es donde se aplica el extracto de hojas de hinojo, podríamos estar ante un suceso de antagonismo entre dos fuerzas que actúan en el patógeno, una positiva y otra negativa para su supervivencia. La fuerza negativa sería la misma que ocurre a nivel de toda la planta, es decir, la inducción de resistencia en judía por parte del hinojo. Se ha demostrado la resistencia inducida por diferentes extractos de plantas y otras sustancias derivadas de plantas frente a varios patógenos (Mosch *et al.*, 1996; Song *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha visto que diferentes azúcares y ácidos orgánicos aplicados directamente (Vercesi *et al.*, 1997) o como exudados de plantas (Fourie & Holz, 1998) estimulan el crecimiento de *Botrytis*, y el hinojo tiene sustancias que podrían estimular su crecimiento (Barros *et al.*, 2010), luego el patógeno tendría un crecimiento mejor a nivel local que en el resto de la planta donde no se ha aplicado el extracto, lo que conllevaría a una mayor severidad en dicha zona. Estos dos factores (positivo y negativo) se equilibrarían de manera que no se produjese ningún cambio a nivel local respecto al control en el que no se aplicó ningún extracto. Otra posible explicación más simple a la falta de protección observada a nivel local es el bajo tamaño muestral; al aumentar el número de datos quizás las pruebas estadísticas realizadas pudieran dar diferencias significativas. Estas son posibles hipótesis que explicarían el resultado obtenido; podría ser interesante la realización de estudios futuros que intentaran probar estas dos posibilidades. A nivel sistémico no habría efecto directo del hinojo sobre el crecimiento del hongo, entonces la única explicación a la disminución de síntomas es la resistencia inducida en la planta. NO obstante esta explicación contrasta con otros estudios en los que se ha observado actividad antifúngica de extractos y aceites esenciales de hinojo (He & Huang, 2011;

Shahat *et al.*, 2011; Aminifar & Mohammadi, 2013) y de aceites esenciales de otras plantas (Vitoratos *et al.*, 2013) sobre *Botrytis* y otros hongos.

Una explicación hipotética del hecho de que el hinojo haya dado resultados de inducción con un extracto congelado pero no con un extracto fresco puede ser la siguiente: al congelarse se pueden producir cambios en las hojas de hinojo; se pueden degradar metabolitos, dando lugar a otras sustancias. Estas sustancias que no están presentes en el hinojo fresco pero pueden aparecer de forma secundaria en el hinojo congelado podrían ser las responsables de la inducción de resistencia. Esta hipótesis sería interesante como objeto de estudios futuros.

Un aspecto positivo de aplicación práctica de agentes inductores frente a los fungicidas industriales que se emplean frente a *Botrytis cinerea* es que no perderían efectividad por adquisición de resistencia al producto por parte del hongo, como es el caso de los segundos. Los agentes inductores aumentan la defensa de la planta, es decir, no tienen un efecto directo sobre el patógeno, a diferencia de los fungicidas. La gran plasticidad genética de *B. cinerea* hace que éste adquiera resistencia ante muchos fungicidas (Williamson *et al.*, 2007); en cambio, un agente inductor que no ataca directamente al patógeno, no puede provocar que éste se vuelva resistente.

La actividad enzimática de la peroxidasa a nivel sistémico presentó niveles iguales en todos los tratamientos realizados. Este resultado no concuerda con el dado por Ishida *et al.*, 2008, que indican un aumento en los niveles de esta enzima en plantas de algodón inducidas por acibenzolar-S-metil (ASM) frente a *Xanthomonas axonopodis*. Quizás, los resultados hubieran dado diferencias significativas si se hubiera medido la actividad en otros momentos, anteriores o posteriores al analizado. La actividad β -1,3 glucanasa sí que presenta niveles diferentes en los tratamientos: hay una disminución en la actividad de esta enzima al añadir el extracto de hinojo congelado en condiciones normales, es decir, cuando la planta no ha sido inoculada con *B. cinerea*. En cambio, tras la inoculación con el hongo, los niveles de actividad β -1,3 glucanasa aumentan si hemos aplicado el extracto con respecto al control inoculado. El aumento de actividad con extracto tras la inoculación es un indicador de que el extracto de hinojo sea un potencial inductor de resistencia (Mauch & Staehelin, 1989; Ishida *et al.*, 2008; Salas & Zamora, 2009). La actividad de esta enzima se mantiene igual cuando aplicamos el extracto, esté o no inoculada la planta. La presencia de *Botrytis* induce una menor actividad β -1,3 glucanasa en el control a nivel sistémico. Hay estudios que demuestran una manipulación de las vías de señalización de defensa de la planta huésped por parte de

B. cinerea (El Oirdi *et al.*, 2011 lo ha comprobado en plantas de tomate), por lo que podría estar ocurriendo lo mismo en judía. El hongo, al ser necrotrofo, induce en la planta la vía de señalización de defensa dependiente de JA y ET, pero a la vez *Botrytis* produce una señal (un polisacárido) que induce la vía de señalización dependiente de SA, que a su vez inhibe la otra ruta (El Oirdi *et al.*, 2011). La presencia del hinojo también induce una menor actividad β -1,3 glucanasa, lo que podría explicarse con una posible presencia de señales en el hinojo que inhiban la actividad de esta enzima en la judía. Es necesario seguir estudiando las propiedades de este extracto de hinojo para comprender mejor su función inductora y aislar los compuestos responsables de la misma.

6.- Conclusiones.

1. Se ha comprobado que un extracto de hojas de *Foeniculum vulgare* Mill. (hinojo) induce resistencia a nivel sistémico pero no a nivel local en *Phaseolus vulgaris* L. (judía) frente a la infección por *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (moho gris).
2. Se ha determinado que la aplicación de un extracto de hojas de hinojo congelado en hojas de judía no aumenta los niveles de peroxidasa a nivel sistémico; en cambio, sí que produce una disminución de la actividad β -1,3 glucanasa antes de la inoculación con *B. cinerea* y un aumento de actividad tras la inoculación.

7.- Bibliografía.

- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. 5^a ed. Elsevier.
- Aminifard, N. H. & Mohammadi, S. (2013). Essential oils to control *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in vivo* on plum fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**: 348–353.
- Barros, L., Carvalho, A. M. & Ferreira, I. (2010). The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT-Food Science and Technology* **43**: 814–818.
- Cantore, P. L., Iacobellis, N. S., Marco, A. D., Capasso, F. & Senatore, F. (2004). Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var.

vulgare (Miller) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 7862-7866.

- Diao, W.-R., Hu, Q.-P., Zhang, H., Xu, J.-G. (2014). Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control* **35**: 109-116.

- Díaz, J., Have, A. & Van Kan, J. A. L. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **129**: 1341-1351.

- Díaz Leal, J. L. (2012). Caracterización molecular del metabolismo del alantoato en judía (*Phaseolus vulgaris*). Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.

- El Oirdi, M., Rahman, T. A., Rigano, L., Hadrami, A., Rodríguez, M. C., Daayf, F., Vojnov, A. & Bouarab, K. (2011). *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *The Plant Cell* **23**: 2405–2421.

- Fourie, J. F. & Holz, G. (1998). Effects of fruit and pollen exudates on growth of *Botrytis cinerea* and infection of plum and nectarine fruit. *Plant Dis.* **82**: 165-170.

- García-Jiménez, N., Pérez Alonso, M. J. & Velasco-Negueruela, A. (2000). Chemical composition of fennel oil, *Foeniculum vulgare* Miller, from Spain. *Journal of Essential Oil Research* **12**: 159-162.

- He, W. & Huang, B. (2011). A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**: 3595-3600.

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

- Ishida, A. K. N., Souza, R. M., Resende, M. L. V., Cavalcanti, F. R., Oliveira, D. L. & Pozza, E. A. (2008). Rhizobacterium and acibenzolar-S-methyl (ASM) in resistance induction against bacterial blight and expression of defense responses in cotton. *Tropical Plant Pathology* **33**: 27-34.

- Lucas, J. A. (1998). *Plant Pathology and Plant Pathogens*. 3^a ed. Blackwell Publishing.

- Mauch, F. & Staehelin, L.A. (1989). Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and & 1,3-glucanase in bean leaves. *The Plant Cell* **1**: 447-457.

- Mishra, A. K., Sharma, K., Misra, R.S. (2012). Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of Plant Interactions* **7**: 95-120.

- Mosch, J., Zeller, W., Rieck, M., Ullrich W. (1996). Further studies on plant extracts with a resistance induction effect against *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* **411**: 361-366.
- Nuez, F., Pérez de la Vega, M. & Carrillo, J. M. (2004). Resistencia genética a patógenos vegetales. Editorial de la UPV.
- Pieterse, C. J. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**: 308-316.
- Salas, C. & Zamora, H. M. (2009). β -1,3 glucanasas de los espacios intercelulares de hojas de tomate *Lycopersicon esculentum* var. ciraciforme después de infección con *Phytophthora infestans*. *Revista colombiana de química (Bogotá)* **38**: 43-59.
- Shahat, A. A., Ibrahim, A. Y., Hendawy, S. F., Omer, E. A., Hammouda, F. M., Abdel-Rahman, F. H. & Saleh, M. A. (2011). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules* **16**: 1366-1377.
- Smith, A. M., Coupland, G., Dolan, L., Harberd, N., Jones, J., Martin, C., Sblowski, R. & Amey, A. (2010). Plant biology. Garland Science.
- Song, G. C., Ryu, S. Y., Kim, Y. S., Lee, J. Y., Choi, J. S. & Ryu, C.-M. (2013). Elicitation of induced resistance against *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae* by specific individual compounds derived from native Korean plant species. *Molecules* **18**: 12877-12895.
- Spoel, S. H. & Dong, X. (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host and Microbe* **3**: 348-351.
- Stoscheck, C.M. (1990). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology* **182**: 50-68.
- Van der Ent, S., Koornneef, A., Ton, J. & Pieterse, C.M.J. (2009). Induced resistance-orchestrating defence mechanism through crosstalk and priming. *Annual Plant Reviews* **34**: 334-370.
- Van Kan, J. A. L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* **11**: 247-253.
- Veloso, J., Prego, C., Varela, M. M., Carballeira, R., Bernal, A., Merino, J. & Díaz, J. (2014). Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. *Plant Biology* **16**: 177-185.

- Vercesi, A., Locci, R. & Prosser, J. I. (1997). Growth kinetics of *Botrytis cinerea* on organic acids and sugars in relation to colonization of grape berries. *Mycological Research* **101**: 139-142.
- Vitoratos, A., Bilalis, D., Kaarkanis, A. & Efthimiadou, A. (2013). Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **41**: 86-92.
- 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.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. & Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* **8**: 561-580.
- Zeller, W. (2006). Status on induced resistance against plant bacterial diseases. *Fitosanidad* **10**: 99-103.