



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Evaluación de Biolet en la resistencia
de tomate a *Phytophthora infestans*

Iván Pensado Méndez

2014

Directores: Cristina Silvar y Federico Pomar

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	2
El tomate.....	3
Phytophthora infestans.....	3
Tipos de Resistencia.....	5
Resistencia Inducida.....	6
Agentes inductores de resistencia.....	7
Proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR).....	7
Fenilalanina amonio liasa (PAL).....	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
Material vegetal.....	10
Material fúngico y obtención del inóculo.....	10
Tratamiento de las plantas y toma de muestras.....	10
Inoculación y determinación de la magnitud de las lesiones foliares.....	11
Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	11
Diseño de oligodinucleótidos y medida de la expresión génica.....	12
Extracción de la enzima PAL.....	13
Determinación de la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL).....	13
Análisis estadísticos.....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
Inducción de resistencia.....	14
Expresión del gen PR-1 tras la inducción con Biolet.....	16
Actividad de la enzima PAL tras la inducción con Biolet.....	18
5. CONCLUSIONES.....	22

RESUMEN

Las enfermedades provocadas por diferentes patógenos son motivo de numerosas pérdidas económicas en los cultivos de interés agrícola como el tomate. El empleo de agentes de resistencia inducida proporciona un sistema mediante el cual las plantas pueden afrontar mejor los ataques de diversas bacterias, hongos o virus. Estos métodos proporcionan una serie de ventajas frente a los fungicidas o pesticidas empleados normalmente, resultando en muchos casos más económicos y menos dañinos para el medio ambiente.

El objetivo de este trabajo fue observar el efecto del compuesto comercial Biolet en la inducción de resistencia en plantas de tomate, usando como indicadores de la respuesta de defensa el gen PR-1 y la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL).

El tratamiento de las plantas de tomate con Biolet sirvió como protección frente a un ataque posterior por el oomiceto *Phytophthora infestans*. Dicha protección se puso de manifiesto como una reducción en el diámetro de las lesiones necróticas formadas tras la infección con el patógeno, así como a través de un incremento en los niveles de expresión del gen PR-1. El ligero aumento de la actividad PAL detectado tras la inducción con Biolet, sugiere que esta enzima no es activada de forma directa después del tratamiento inductor, sino a través de un fenómeno de "priming".

1. INTRODUCCIÓN

El tomate

El tomate, *Solanum lycopersicum* L., pertenece a la familia *Solanaceae*, una de las más grandes del reino vegetal con más de 3000 especies diseminadas por todo el mundo. Las solanáceas son en su mayoría plantas herbáceas, arbustivas o de pequeño porte arbóreo. Presentan hojas generalmente simples y alternas, mientras que las flores son hermafroditas, solitarias o reunidas en inflorescencias cimosas. Se trata de una familia cosmopolita, pues sólo está ausente en las zonas más frías del hemisferio norte y en las extremas condiciones desérticas. Asimismo, esta familia se caracteriza por contar con abundantes especies que contienen diversos tipos de alcaloides más o menos activos o venenosos, tales como la atropina, escopolamina y la nicotina.

En la actualidad, el cultivo de tomate se encuentra extendido alrededor del mundo, ya que está adaptado a un amplio rango de condiciones climáticas, desde los trópicos a regiones templadas (Panthee y Cheng, 2010). En España, el tomate es la especie hortícola que ocupa la mayor superficie de cultivo (63.838 Ha), con una producción anual superior a los 4 millones de toneladas (MAGRAMA, 2010).

Además de su importancia en la horticultura, el tomate ha sido ampliamente utilizado como planta modelo para el estudio de las bases moleculares de la interacción planta-patógeno, así como en estudios genéticos relacionados con la calidad del fruto y tolerancia al estrés (Panthee y Cheng, 2010). La reciente secuenciación del genoma del cultivar 'Heinz 1706' y de su pariente silvestre *Solanum pimpinellifolium* (*The tomato genome consortium*, 2012) abren grandes expectativas de cara a estudiar y mejorar caracteres agronómicos clave.

A pesar de la enorme importancia de este cultivo y de los grandes avances en el campo de la mejora genética vegetal, todavía son varios los agentes fitopatógenos capaces de infectar al tomate y causar enfermedades, provocando considerables pérdidas económicas (Melgarejo *et al.* 2010).

Phytophthora infestans

Phytophthora infestans pertenece al Phylum Oomycota, clase Oomicetes, orden Peronosporales, familia *Pythiaceae* y género *Phytophthora* (Dick, 1990). *P. infestans* es el responsable de la enfermedad conocida como mildiu o "late blight", una de las amenazas más severas para la producción del tomate. *P. infestans* tiene un comportamiento hemibiotrófico, es decir, combina estrategias de los organismos necrotrofos y biotrofos en diferentes momentos de su ciclo vital. Así, en las primeras etapas de la infección se comporta como un biotrofo alimentándose de las células de los tejidos vivos, mientras que en las etapas finales produce sustancias tóxicas y enzimas hidrolíticas que rompen la

pared de las células de la planta, produciendo severos daños en los tejidos.

En su ciclo vital (Fig. 1) posee diferentes estrategias para atacar a la planta. Inicialmente los haustorios se forman dentro de la célula, pero posteriormente se extienden lesiones necróticas por la superficie foliar. Los esporangios se forman en estas regiones, liberando zoósporas que caen al suelo. Éstas son flageladas y permanecen sobre la capa acuosa del suelo, pudiendo enquistarse en la superficie del huésped mediante extrusión de capas de mucílago.

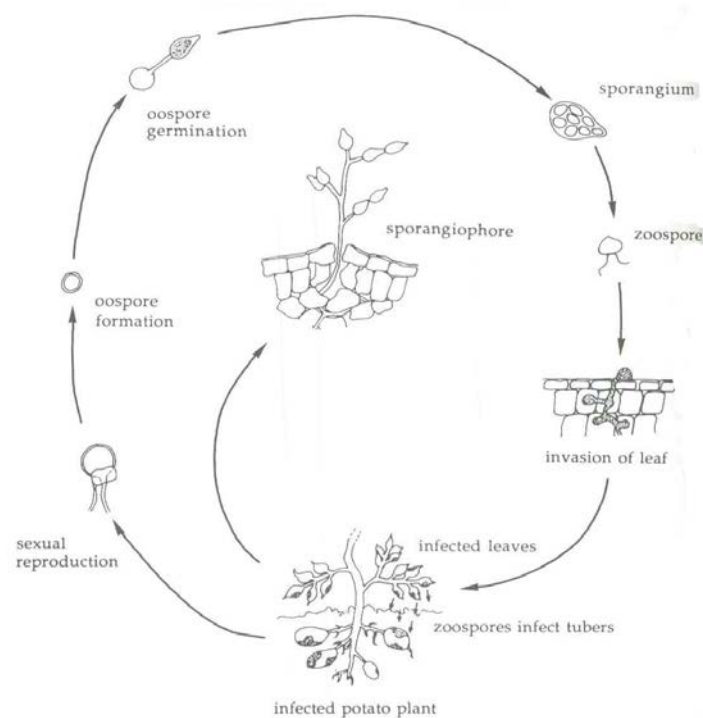


Figura 1. Ciclo vital del oomiceto *P. infestans*. Imagen tomada de Isaac (1992).

En el tomate, *P. infestans* ataca a la parte aérea de la planta y en cualquier etapa de desarrollo. La enfermedad aparece en condiciones de humedad relativa alta (mayor de 90%) y temperaturas entre 10-25° C. La propagación del hongo se debe a lluvias y vientos, riegos por aspersión, rocíos y gotas de condensación (Schumann y D'Arcy, 2000). La sintomatología consiste en la presencia de lesiones necróticas oscuras en todas las hojas. Las lesiones se extienden rápidamente a todo el tejido foliar y en condiciones húmedas se rodean de masas blancas de esporangióforos. También coloniza el tallo y el tubérculo, causando en este último una podredumbre blanda de color pardo oscuro (Melgarejo *et al.*, 2010).

Se estima que este hongo ha causado pérdidas económicas equivalentes a miles de millones de dólares, debido a los daños en el cultivo y el incremento del coste de los

fungicidas. Los cultivos actuales y emergentes son solo parcialmente resistentes a la enfermedad, por lo que todavía a día de hoy necesitan el uso frecuente de fungicidas, los cuales tienen efectos adversos para el ambiente y la salud humana (Thakur y Sohal, 2013). Una opción para reducir el coste añadido del uso de fungicidas en cultivos parcialmente resistentes o susceptibles es el uso de la resistencia inducida, es decir, el uso de la capacidad de la planta para movilizar sus propios mecanismos de resistencia para luchar contra las infecciones una vez expuesta a un estrés de tipo biótico o abiótico.

Tipos de Resistencia

La resistencia en las plantas se divide a menudo en no específica o específica de huésped. La no específica es la más común debido a la potencial cantidad de patógenos distintos, y describe una situación en la que el patógeno es incapaz de vencer las barreras de defensa inespecíficas que produce la planta. Las respuestas específicas involucran interacciones entre genotipos específicos de patógenos y huéspedes, y proporcionan resistencia a un tipo de patógeno en concreto (Agrios, 2005).

La resistencia no específica está basada en receptores de la superficie celular que reconocen moléculas comunes a muchas clases de microorganismos, incluidos no patógenos. En las respuestas específicas el reconocimiento por parte de la planta se produce normalmente porque el patógeno segrega los productos de genes Avr (avirulencia) que interactúan con los productos de genes de resistencia (R) de la planta. Cuando ambos genes están presentes, la identificación se produce, lo que lleva a activar la resistencia de la planta y la virulencia del patógeno. Como resultado de la interacción de los dos, se produce una cascada de transducción de la señal que conlleva la activación de las respuestas de defensa de la planta, asociadas a la restricción del crecimiento del patógeno. Si alguno de los genes del patógeno o del huésped están ausentes no se produce el reconocimiento y se producen los síntomas de una enfermedad (Jones, 2001; Dangl y Jones, 2001).

Para explicar el sistema inmune de la planta, Jones y Dangl (2006) propusieron el modelo en zig-zag. Según este modelo, las moléculas por las que la planta reconoce a un patógeno son los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), por lo que este tipo de defensa se denomina inmunidad provocada por PAMPs (PTI). En muchos casos existen patógenos que sintetizan moléculas capaces de paliar las respuestas PTI. Estas moléculas efectoras permiten al patógeno colonizar la planta, dándose una susceptibilidad a estos (ETS), generándose una presión selectiva que va a favorecer a los genotipos que desarrollen proteínas que reconozcan a las moléculas efectoras (las proteínas R). Este tipo de resistencia se denomina inmunidad provocada por efectores (ETI). Muchos patógenos intentarán eludir la ETI cambiando sus moléculas efectoras, del mismo modo que la planta desarrollará nuevos genes R para reconocerlos, teniendo lugar

un proceso coevolutivo.

Resistencia Inducida

La resistencia inducida es un estado fisiológico de mejora en la capacidad de defensa provocada por estímulos ambientales específicos, por lo que las defensas de la planta se mejoran contra posteriores ataques de patógenos. Este estado puede ser activado tanto por ETI como por PTI. Existen tres tipos de respuestas sistémicas llevadas a cabo por factores bióticos, la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), la Resistencia Sistémica Inducida (ISR), llevada a cabo por microorganismos no patogénicos y la resistencia inducida por herbívoros (Pieterse y Van Loon, 1999). Además, compuestos como el ácido amino butírico (BABA), el benzotiodiazol (BTH), el ácido salicílico (SA) o el ácido dicloroisonicotínico (INA) han mostrado ser inductores de resistencia (Amzalek y Cohen, 2007).

A menudo, la resistencia inducida va precedida de una respuesta hipersensible (HR). La HR fue descrita por primera vez por Stakman en 1925, y es una fase rápida que se manifiesta inicialmente con la muerte celular programada de algunas células (necrosis) en la zona de local de infección, para así impedir el avance del patógeno. El desarrollo de la resistencia sistémica normalmente consiste en la progresión de la resistencia a toda la planta, y se produce tras la HR (García-Brugger *et al.* 2006).

La resistencia sistémica adquirida (SAR) fue la que primero se describió y la que mejor se conoce. Esta resistencia sistémica puede ser activada por agentes bióticos y abióticos, y confiere resistencia contra un amplio espectro de patógenos, aunque parece ser más efectiva contra patógenos biotrofos (Kliebenstein y Rowe, 2008). La SAR está asociada con la acumulación de ácido salicílico (SA) que conlleva una activación de la expresión de los genes que codifican para las proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogénesis) (Ramírez *et al.*, 2010). En plantas solanáceas, se han observado diversos tipos de respuestas defensivas no sólo con SA sino también con BABA u otros compuestos. Entre éstas, destacan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un incremento en la deposición de calosa (Bengtsson *et al.* 2014).

Otro tipo de respuesta sistémica es la resistencia sistémica inducida (ISR) (Pieterse *et al.*, 1998). Este fenómeno de resistencia inducida fue descubierto más recientemente que la SAR y pronto se observó que el conjunto de mecanismos que actuaban en la ruta de señalización que desencadenaba la ISR diferían claramente de aquellos que participaban en la clásica resistencia sistémica adquirida (SAR). Así, se observó que, al contrario que en la SAR, la ISR no está mediada por SA sino por ácido jasmónico (JA) y etileno, y no está asociada a la aparición de proteínas PR (Vallad y Goodman, 2004).

Agentes inductores de resistencia

La resistencia en plantas puede inducirse por un amplio rango de compuestos bióticos y abióticos (Da Rocha y Hammerschmidt, 2005; Walters *et al.* 2014). Entre los agentes bióticos capaces de inducir resistencia podemos encontrar virus, bacterias, levaduras y hongos (Punja y Utkhede, 2003). El uso de inductores de resistencia biológicos ha demostrado ser efectivo para inmunizar a la planta contra diversos patógenos. Los hongos micorrízicos y las rizobacterias promotoras del crecimiento promueven el desarrollo de la planta y la disminución de los síntomas de la enfermedad (Ryu *et al.* 2004). Otros elicitores de resistencia de tipo biótico que han cobrado especial importancia en los últimos años son los extractos de algas, que contienen compuestos complejos como fucanos sulfatados o β -1,3-glucanos (Cluzet *et al.* 2004; Jaulneau *et al.*, 2011). Dentro de los compuestos abióticos, son muchas las sustancias químicas sintéticas o de origen vegetal capaces de inducir resistencia. Dentro de éstas, se encuentran el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA), el ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), el ácido amino butírico (BABA) (Walters *et al.* 2014). El primer activador de resistencia de origen químico, el probenazol, fue registrado en Japón en 1975, y desde entonces se han desarrollado gran cantidad de compuestos de este tipo orientados a la protección de los cultivos (Oostendorp *et al.*, 2001). Muchos de ellos, han sido registrados como productos comerciales, incluyendo el ASM (Acibenzolar-S-metil), registrado como Bion y Actigard (Syngenta). Los inductores de resistencia químicos han mostrado ser efectivos contra hongos, bacterias y virus (Edreva, 2004). Estos compuestos normalmente inducen la SAR (Da Rocha y Hammerschmidt, 2005).

En la actualidad, el uso de diferentes sustancias como inductores de resistencia es un área en la que se sigue trabajando activamente, centrándose en el descubrimiento de nuevos compuestos que sean más rentables y menos dañinos para el medio ambiente.

Proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR)

Las proteínas PR (*Pathogenesis Related-proteins*) son un conjunto de proteínas inducidas y acumuladas local y sistémicamente en respuesta a la infección. El término proteínas PR fue acuñado en 1980 para definir un grupo de polipéptidos de plantas que se acumulaban en condiciones patológicas o situaciones relacionadas (Cutt y Kleissig, 1992). Estas proteínas se habían descrito por primera vez en 1970 en hojas de ciertos cultivares de tabaco (*Nicotiana tabacum*) después de la infección con el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Cutt y Kleissig, 1992). Las proteínas PR tienen características fisico-químicas que les permiten resistir el pH más ácido y la escisión proteolítica; sobreviviendo en los ambientes duros donde actúan: el compartimento vacuolar, la pared celular o los espacios intercelulares. Estas proteínas se han clasificado en diversos grupos, desde la familia PR-1 hasta la PR-17, según las diferentes funciones que

desempeñan (Van Loon *et al.*, 2006). Por ejemplo, muchas de ellas son β -1,3-glucanasas como la familia PR-2, o bien poseen actividad quitinasa, como las proteínas PR-3.

La familia PR-1 constituye el grupo de proteínas PR más abundante. Estas proteínas se expresan en respuesta a varios estímulos externos, incluyendo patógenos, heridas, compuestos químicos, hormonas y luz UV (Van Loon *et al.*, 2006). La proteína ácida PR-1a de *Nicotiana tabacum* fue la primera en ser purificada y caracterizada (Antoniw *et al.*, 1980) y ha pasado a ser el miembro tipo de la familia PR-1. Desde entonces, se han aislado muchas isoformas de las proteínas PR-1 y se han clonado y secuenciado muchos genes que codifican para ellas en distintas especies de plantas (Liu y Xue, 2006; Mitsuhashi *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011). A pesar de las muchas investigaciones llevadas a cabo en esta familia, la función de las proteínas PR-1 en las plantas todavía se desconoce. Sin embargo, se sugiere que desempeñan un papel en la respuesta de defensa de la planta en tanto que se ha demostrado su actividad antifúngica y antimicrobiana (Cutt y Klessig, 1992).

En multitud de trabajos se ha cuantificado la expresión génica de estas proteínas tras la infección con diversos patógenos, y se ha visto que sus niveles se relacionan con el grado de respuesta defensiva que lleva a cabo la planta (Duijff *et al.*, 1998). En el caso de la familia PR-1, la acumulación de transcritos y proteínas PR-1 es respuesta a agentes inductores se utiliza habitualmente como un indicador de la resistencia inducida tipo SAR (Pieterse y van Loon, 1999; Hermann *et al.*, 2013).

Fenilalanina amonio liasa (PAL)

Los fenoles desempeñan un rol importante en la defensa de la planta ante infecciones fúngicas, ya que son tóxicos para el patógeno y además son componentes necesarios para la formación de lignina que endurece la pared celular (Isaac, 1992). Una de las enzimas clave en la síntesis de los compuestos fenólicos es la fenilalanina amonio liasa (PAL), la cual cataliza la desaminación de la fenilalanina a ácido trans-cinámico, que constituye el precursor común de la biosíntesis de derivados fenólicos que son esenciales para el desarrollo adaptativo, vascular y reproductivo de las plantas (Jones, 1984). Muchos de estos compuestos fenólicos desempeñarán algún papel en la repuesta de defensa de la planta, como es el caso de las fitoalexinas, los compuestos estructurales de la pared celular o moléculas señalizadoras como ácido salicílico (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996). Un incremento en la actividad de la PAL o en los genes que codifican para dicha enzima se ha relacionado habitualmente con los mecanismos de resistencia de la planta frente a distintos patógenos, así como con los procesos de resistencia inducida (Gayoso *et al.*, 2010; Kamble *et al.*, 2013). Por este motivo, la actividad PAL se ha utilizado también como un indicador para cuantificar el grado de respuesta defensiva alcanzado por la planta tras la inducción.

2. OBJETIVOS

En este trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

- Inducción de resistencia a *P. infestans* en tomate usando como agente inductor el compuesto comercial Biolet, de la empresa BioVert S.A.
- Evaluación de la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) y de la expresión del gen PR-1 como indicadores del desencadenamiento de los mecanismos de defensa de la planta en respuesta a la inducción.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas de tomate de la variedad MoneyMaker, proporcionadas por la empresa "Thompson & Morgan" (Ipswich, UK). Las semillas fueron esterilizadas mediante inmersión en una solución de lejía al 10% durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron con abundante agua destilada, y se sembraron en una bandeja utilizando como sustrato vermiculita estéril. La germinación de las plántulas y su crecimiento tuvo lugar en una cámara de cultivo, con condiciones de temperaturas de 25-18 °C y un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, respectivamente.

Al cabo de una semana se tranplantaron a bandejas de alvéolos individuales que contenían una mezcla de tierra y perlita (2:1). Transcurridas 2 semanas desde la germinación las plantas fueron usadas para los distintos experimentos que describiremos.

Material fúngico y obtención del inóculo

El aislado de *P. Infestans* NLII525, aislado de plantas de tomate, fue amablemente cedido por el Dr. Geert Kessel, del *University and Research Center of Wageningen* (Holanda). Este aislado de *P. Infestans* se mantuvo en medio PDA a 20-22°C y en oscuridad. Cuando el micelio cubría toda la placa, se realizaron repicados en el borde de aproximadamente 2 cm² que eran transferidos a nuevas placas de medio PDA para promover el crecimiento.

Para obtener el inóculo, el cultivo del hongo se inició 10 días aproximadamente antes de la infección. La suspensión de esporangios se obtuvo añadiendo 3 mL de agua destilada estéril y fría (4°C) sobre la placa, frotando repetidamente toda la superficie del agar con un asa de Digralski previamente esterilizada. Todos los procesos se realizaron en una cámara de flujo laminar. Para el recuento de esporangios se utilizó una cámara de Malassez, lo que permitió conocer la concentración de la suspensión, que se ajustó a 1x10⁵ esporangios/mL.

Tratamiento de las plantas y toma de muestras

La inducción de resistencia se realizó con el compuesto Biolet, de la empresa Biovert S.A. (Lleida, España). Este producto consiste en una mezcla de microelementos (Cu 2.07%, Mn 0.89%, Zn 0.59%) y sales de aluminio (lignosulfonato de aluminio), que se comercializa como bio-estimulante, nutricional y agente fortificante.

Las plantas se dividieron en diferentes grupos según su tratamiento. En primer lugar se separaron plantas control, sólo tratadas con agua y plantas tratadas con Biolet. Éstas a su vez se dividieron entre tres tratamientos con diferentes concentraciones de

Biolet: 1, 2,5 y 5 cc/L. (Fig. 2).

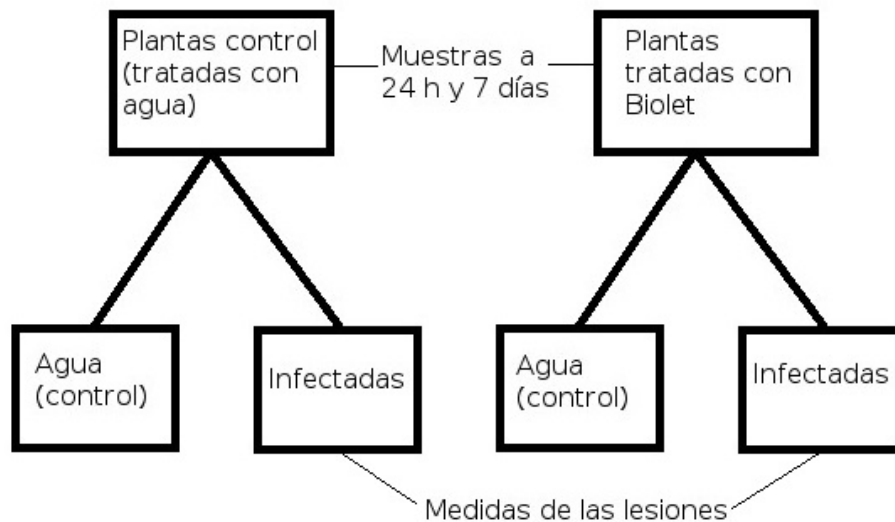


Figura 2. Diseño experimental del trabajo realizado, donde se indican las plantas utilizadas para la toma de muestras y las plantas infectadas.

A las 24 horas y a los 7 días después del tratamiento, se tomaron muestras de hojas en las tres concentraciones de Biolet y en el control. Estas hojas se pesaron y se congelaron con nitrógeno líquido, siendo almacenadas a -80 °C hasta el momento de su uso.

Inoculación y determinación de la magnitud de las lesiones foliares

La inoculación se realizó 7 días después del tratamiento de las plantas con Biolet, usando 5 plantas de cada uno de los grupos antes descritos: plantas control y las plantas tratadas con las diferentes concentraciones de Biolet. Para realizar la inoculación se usaron 10 µl de la suspensión de esporangios que se dispusieron en las hojas más grandes de las plantas, evitando los nervios foliares y pipeteando como máximo 2 gotas de inóculo por cada hoja.

A los seis días tras la infección, se realizaron medidas del tamaño de las lesiones necróticas en las hojas de las plantas control y en las plantas tratadas con diferentes concentraciones de Biolet utilizando un calibre digital Mitutoyo con el software correspondiente para PC.

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Las hojas se homogenizaron en un mortero utilizando nitrógeno líquido hasta formar un polvo. 60 mg de este homegenizado se emplearon para la extracción de RNA mediante el Aurum™ Total RNA mini kit de BioRad, siguiendo el protocolo que especifica el fabricante. La cantidad de RNA en cada caso se determinó mediante medidas

espectrofotométricas a 260 nm. Una vez conocida la concentración de RNA, 500 ng de este se utilizaron para la retotranscripción inversa con el iScript cDNA synthesis kit de BioRad.

Diseño de oligodinucleótidos y medida de la expresión génica

Los cebadores para PCR en tiempo real, se diseñaron con el software Primer3 (Untergrasser *et al.*, 2012) a partir de las secuencias de los genes disponibles en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) y en el Munich Information Center for Protein Sequence (MIPS) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/tomato/index.jsp>) (Tabla 1). El gen PR-1 fue seleccionado en base a su sobreexpresión en un estudio previo de microarrays (datos no publicados). El gen de la tubulina β de tomate fue utilizado como "housekeeping" o control endógeno que se expresa constitutivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Tabla con las secuencias de los oligodinucleótidos empleados en la PCR en tiempo real.

Oligo	Gen	Secuencia (5´-3´)	Amplicón (bp)
PR1_fw	NW_004196001.1	tccgagaggccaagctataa	149
PR1_rv		ttgcaagaaatgaaccacca	
Tubulina_fw	Solyc04g081490.2.1	atggtccttgacaacgaagc	165
Tubulina_rv		cacagccaatttctcaggt	

La expresión génica relativa se cuantificó con el sistema de PCR en tiempo real iCycler iQ (BioRad). La mezcla de reacción (50 μ l) se preparó incluyendo 0,3 μ l de cada cebador, 2,5 μ l de cDNA y 1xIQ SYBR Green Supermix (BioRad). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificación: 95 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos y 72 °C 50 segundos. Finalmente se añadió un paso de elongación a 72 °C durante 5 minutos.

El análisis de los resultados se realizó con el software del fabricante, Optical System Software 3.0 (BioRad). La expresión relativa del gen se calculó mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008), donde $\Delta\Delta Ct = [Ct_{GI} \text{ (muestra desconocida)} - Ct_{TUB} \text{ (muestra desconocida)}] - [Ct_{GI} \text{ (muestra control)} - Ct_{TUB} \text{ (muestra control)}]$. El Ct se define como aquel ciclo en el que la emisión de fluorescencia por el producto de la PCR puede distinguirse del fondo. GI es el gen de interés y TUB es el control interno o calibrador (el gen de la tubulina). La muestra control es la muestra que representa el valor 1 \times de expresión para el gen de interés y en nuestro caso son muestras de hojas de plantas mantenidas con agua. Cada medida de expresión se realizó por duplicado.

Extracción de la enzima PAL

Para realizar la extracción de la enzima se homogenizaron las hojas en un mortero utilizando tampón Tris-HCl 0.5 M pH=8, en una proporción 1:2 (p:v). Este homogenizado se centrifugó a 12000 *g* y 4°C durante 10 min. El sobrenadante se recogió en tubos de plástico y fue almacenado a -80 °C hasta el momento en el que se cuantificó la actividad enzimática.

Determinación de la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)

La actividad PAL se determinó siguiendo el método de Beaudoin-Eagan y Thorpe (1985) que se basa en la medida directa de la formación de ácido trans-cinámico a partir de la L-fenilalanina por la acción de la enzima.

Inicialmente, se realizó una recta de calibrado con concentraciones de ácido trans-cinámico de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1 µg/mL. Esta recta patrón nos servirá para interpolar los resultados obtenidos en nuestras muestras.

250 µL de cada una de las muestras resultantes de la extracción se mezclaron con 250 µL de agua destilada, 1000 µL de tampón Tris-HCl 0,1 M y 500 µL de L-fenilalanina 10 mM. Cada mezcla de reacción se incubó durante 60-90 minutos a 37 °C en un baño termostático. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 µL de HCl 5 M a cada tubo para parar la reacción, y se centrifugaron a 15000 *g* y 4 °C durante 15 min. La cantidad de ácido transcinámico formado se determinó a partir de la absorbancia detectada a 290 nm.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS v. 17.0 y consistieron en un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test Duncan de rango múltiple.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de resistencia

La inducción de resistencia se llevó a cabo con tres concentraciones distintas del producto Biolet. La capacidad protectora del tratamiento se determinó a los seis días tras la infección con *P. infestans*. Para ello, se realizaron medidas de las lesiones necróticas en las hojas (Fig. 3A).

Como consecuencia de la infección por el patógeno, las células de la planta se sensibilizan durante la germinación de las esporas y, posteriormente se producen cambios bioquímicos asociados a la adhesión de las superficies externas del micelio fúngico a la membrana plasmática del huésped. Esto desemboca en una reacción incompatible, produciéndose la despolarización de la membrana de las células de la planta y una salida al exterior de electrolitos, llevando a una muerte rápida de las células (Isaac, 1992).

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 3B, que representa el diámetro medio de las necrosis observadas en plantas control y en las tratadas con Biolet. Comparando las medias de los diferentes tratamientos, se pudo observar que las lesiones necróticas mostraron un diámetro ligeramente menor en las plantas tratadas con Biolet respecto a las plantas control. A su vez, dentro de los tratamientos con diferentes concentraciones de Biolet, podemos observar que la media es superior en el tratamiento a concentración 2.5 cc/L de Biolet, la cual no resultó significativamente diferente del control. Sin embargo, para concentraciones de 1 cc/L y 5 cc/L se observó que la magnitud de la lesión (7,73 mm y 7,43 mm, respectivamente) resultó significativamente menor que en aquellas plantas tratadas con agua. Asimismo, aunque no se ha realizado un recuento exhaustivo del número de sitios de infección, es decir, aquellos en los que se depositó inóculo pero donde no se ha detectado una lesión necrótica posterior, sí se observó que las necrosis producidas por gota de inóculo en la concentración mayor de Biolet fueron menores en número, y en muchos casos no se pudieron cuantificar por no desarrollarse una clara destrucción de tejido en las hojas.

La resistencia inducida en plantas hortícolas mediada por agentes químicos ha sido puesta de manifiesto en innumerables trabajos (Oostendorp *et al.*, 2001). En el caso concreto de *P. infestans*, se ha visto que diversos compuestos, como el DL-3-amino-n-butanoico, BABA, INA, bis-aril-metanona o el Acibenzolar-S-metil (ASM) han resultado especialmente efectivos en la protección de patata y tomate frente a la enfermedad (Cohen *et al.*, 1994; Bengtsson *et al.*, 2014; Monjil *et al.*, 2014).

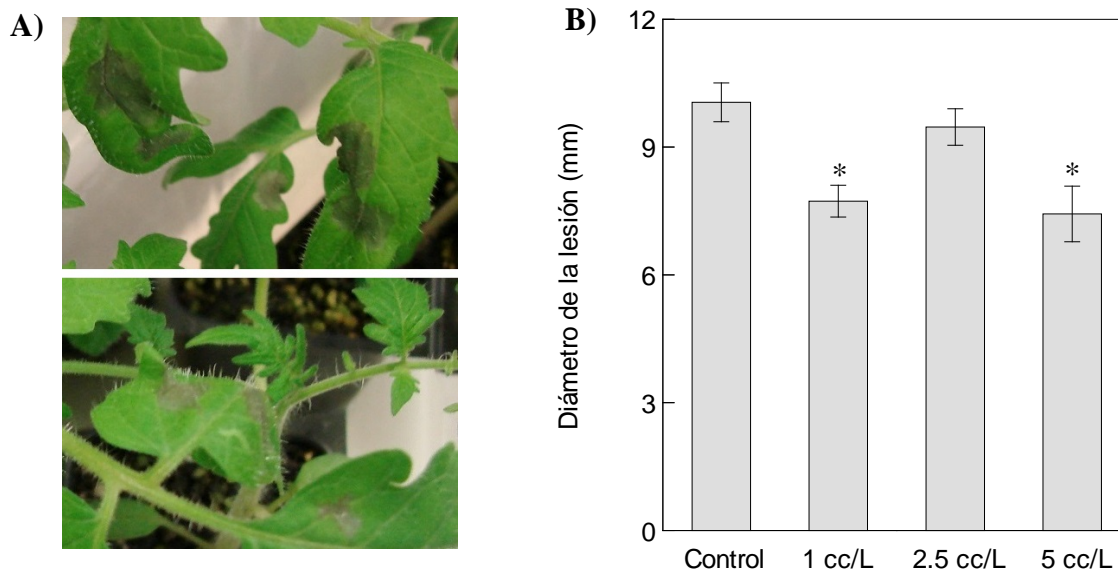


Figura 4. A) Lesión necrótica en una plantas control (arriba) y en una planta tratada con Biolet (abajo) a los 6 días tras la infección. **B)** Media \pm SE de los diámetros de las lesiones necróticas en las plantas control y en las plantas tratadas con Biolet. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Recientemente, se ha demostrado que la exposición al aluminio (Al) como factor abiótico de estrés ha resultado efectiva a la hora de disminuir el desarrollo de la enfermedad en las hojas de plantas de patata (perteneciente a la familia *Solanaceae*, como el tomate) (Arasimowicz *et al.*, 2014). Así, se han obtenido evidencias de la existencia de un fenómeno de resistencia cruzada entre plantas tratadas con Al y *P. infestans*, reduciéndose los síntomas de la enfermedad en torno a un 20-30 %, fenómeno que también parece concordar con nuestros resultados.

Aunque los datos de las lesiones necróticas sugieren la existencia de una inducción de resistencia a *P. infestans* en tomate mediada por Biolet, la efectividad del tratamiento también debería confirmarse con otros indicadores. Así por ejemplo, Bengtsson *et al.* (2014), observaron que el tratamiento de plantas de patata con BABA y su posterior infección con *P. infestans* produjo un incremento en la cantidad de calosa depositada en las paredes celulares de las células asociadas a la HR, así como en las células de guarda estomáticas. Para comprobarlo en nuestro caso, serían necesarios estudios microscópicos con tinciones específicas. Otros posibles ensayos serían la cuantificación de biomasa del micelio del patógeno (Silvar *et al.*, 2005; Gayoso *et al.*, 2007).

Además, la aplicación del producto se realizó directamente sobre las hojas, donde también tuvo lugar la infección con el patógeno. Por tanto, no podemos afirmar con rotundidad que el Biolet actúe solo como un agente inductor de resistencia sino también como un agente fungistático. De hecho, se ha demostrado que algunos elicitores químicos pueden resultar tóxicos de forma directa para el patógeno al mismo tiempo que desencadenan una respuesta de defensa en la planta (Sticher *et al.*, 1997). Para comprobar este supuesto, sería necesario preparar placas de agar PDA con diferentes concentraciones de Biolet, y cultivar cada una de ellas con *P. infestans*.

En cualquier caso, nuestros resultados posteriores sí parecen indicar que se ha desencadenado una respuesta defensiva en la planta.

Expresión del gen PR-1 tras la inducción con Biolet

La técnica de la RT-PCR en tiempo real nos permitió conocer la expresión relativa del gen PR-1 en las plantas tratadas con diferentes concentraciones de Biolet. Para ello se emplearon oligos específicos tanto para el gen de interés como para el gen de la tubulina β , que empleamos para normalizar los resultados.

La expresión relativa del gen se determinó a 24 horas y a los 7 días post-tratamiento. En todos los casos se comprobó que existía un aumento significativo en la expresión del gen PR-1 en plantas tratadas con respecto al control. Sin embargo, a 24 horas de la inducción las plantas tratadas con mayor concentración de Biolet (5cc/L) mostraron una mayor expresión del gen PR-1; mientras que a 7 días post-inducción se produjo una inversión de la situación, ya que en este caso es en las plantas tratadas con la menor concentración de Biolet (1cc/L) donde se observó una mayor expresión. Las plantas tratadas con la concentración de 2.5 cc/L muestran una expresión menor que las otras plantas en ambos tiempos (Fig. 4).

El incremento en los niveles de expresión de genes PR-1 se ha demostrado en otras especies de plantas en respuesta a distintos estímulos (Sarowar *et al.* 2005; Silvar *et al.*, 2009). Sin embargo, el papel específico que desempeñan estas proteínas todavía es desconocido, aunque se ha observado que las formas PR-1 básicas pueden aparecer tanto en la vacuola como en el espacio extracelular donde parecen actuar restringiendo el crecimiento del patógeno (Niderman *et al.*, 1995). Por tanto podemos interpretar que la expresión de PR-1 se ve inducida por el tratamiento con el agente inductor Biolet. En este caso, la composición del Biolet parece provocar la expresión del gen mediante la ruta SAR. Esta ruta se basa en la producción de ácido salicílico (SA) desencadenada normalmente por algún tipo de estrés biótico o abiótico (patógenos, sustancias químicas, etc.). El gen NPR1 (*Non expressor of PR-1*) ha sido identificado como regulador positivo de la ruta de señalización dependiente de SA (Cao *et al.*, 1994, Delaney *et al.*, 1995, Shah *et al.*, 1997). El SA regula el potencial redox que conlleva a una activación post-

traduccional de la proteína NPR1. Durante el crecimiento normal de la planta, la proteína NPR1 está presente en el citosol en forma de oligómero. Debido al SA, el citosol se encuentra en un estado más reducido, lo que provoca que NPR1 sea monomerizada y translocada al núcleo para funcionar como co-activador de la expresión de los genes PR.

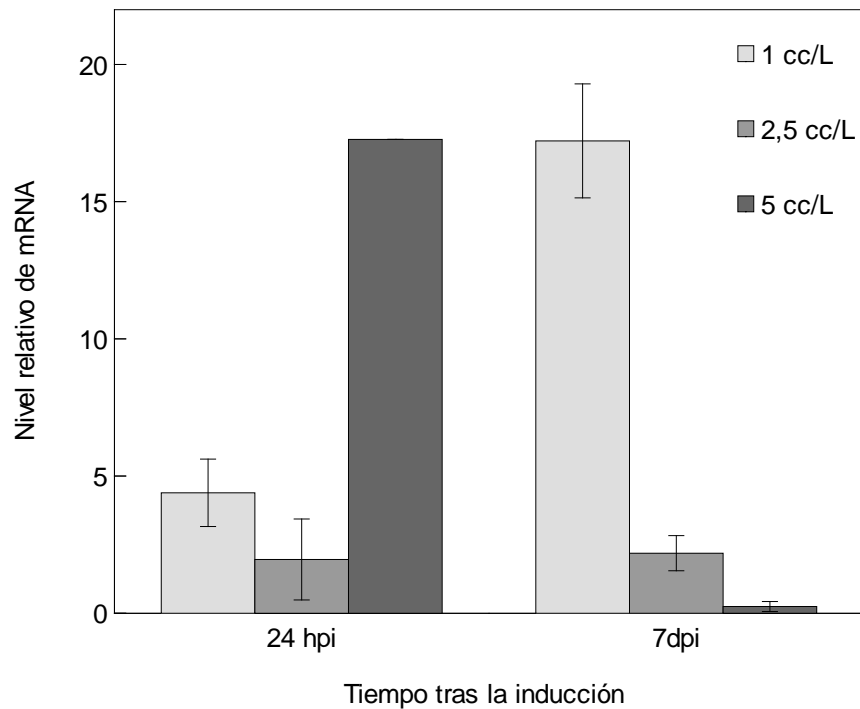


Figura 5. Expresión relativa del gen PR-1 a distintas concentraciones de Biolet a las 24 horas y 7 días tras la inducción. Las expresiones están referidas a las plantas control, representando éstas el valor 1X. Los datos representan la media \pm SE de dos réplicas.

En ensayos con plantas de tomate y de tabaco se ha encontrado una mayor expresión de proteína PR1 en respuesta a oomicetos patógenos que a virus (Alexander *et al.*, 1993), por lo que se han relacionado más activamente con la resistencia antifúngica. En tomate se han identificado tres proteínas PR-1 básicas (inicialmente denominadas P14): PR-1a, PR-1b, PR-1c tras la infección con *P. Infestans* (Niderman *et al.*, 1995). Ensayos *in vitro* e *in vivo* demostraron que PR-1c parece ser la más efectiva a la hora de reducir la germinación de los esporangios y la longitud del tubo germinativo de *P. infestans*, así como de mermar el área de la lesión en hojas infectadas (Niderman *et al.*, 1995). Esta PR-1c de tomate, presenta además una secuencia semejante a la proteína PR-1g de la planta de tabaco, que posee una efectividad similar (van Loon *et al.*, 1994). Las formas PR-1a y PR-1b resultaron menos eficientes a la hora de inhibir al patógeno (Niderman *et al.*, 1995).

Según nuestros resultados, podemos observar que el Biolet es más efectivo a la hora de inducir la expresión del gen PR-1 a concentraciones elevadas (5 cc/L) en intervalos de tiempo de 24 horas. Sin embargo, en intervalos como 7 días después de la inoculación, la concentración más baja es la más efectiva, ya que los patrones de expresión de la proteína PR-1 son mayores. La concentración de 2.5 cc/L parece no ser efectiva a ningún tiempo analizado; sin embargo esto podemos relacionarlo con la ausencia de medidas de expresión a intervalos intermedios. Según ensayos de expresión del gen PR-1 realizados anteriormente en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la UDC, se pudo observar que una concentración intermedia de otros agentes químicos evaluados como inductores de resistencia en tomate, indujo un pico de expresión mayor que las otras concentraciones a 3 días post-inducción (datos no publicados). Podemos hipotetizar, por tanto, que el Biolet inducirá un aumento de la expresión del gen PR-1 que se extiende a lo largo del tiempo según la concentración del producto, de forma que el momento al cual se produce el pico de expresión del gen es inversamente proporcional a la concentración con la que se tratan las plantas.

Además, la expresión de los genes de las proteínas PR-1 parece indicar en nuestro caso un fenómeno de resistencia cruzada o resistencia múltiple. Este fenómeno consiste en que un determinado tipo de estrés puede provocar que la planta adquiera resistencia a otro estrés diferente, debido a que la planta media ambos tipos de respuestas por señales similares (ROS, BABA, SA, JA, ABA) (Steinberg, 2012). Según los trabajos de Arasimowicz *et al.* (2013) se ha comprobado que el aluminio induce este tipo de resistencia en plantas de patata infectadas posteriormente con *P. Infestans*. La exposición al Al incrementó la expresión de la PR-1 en las raíces de las plantas, y se comprobó que las concentraciones de Al pueden modular la acumulación de SA, NO y H₂O₂ en las hojas incrementándose la concentración de estos compuestos hasta tres veces respecto a plantas no tratadas (Arasimowicz *et al.* 2013). Estos compuestos, tal y como se ha explicado anteriormente, forman parte de la señal que modula la respuesta defensiva de la planta.

Actividad de la enzima PAL tras la inducción con Biolet

El estado de resistencia inducida conlleva muchos cambios metabólicos fruto de las señales desencadenadas por el inductor, que son transportadas por toda la planta. Además de las proteínas PR ya descritas, se produce la síntesis de fitoalexinas y la activación de enzimas de la ruta fenilpropanoide como es el caso de la fenilalanina amonio liasa (PAL). Esta enzima está involucrada en la síntesis de compuestos fenólicos y derivados, como flavonoides, fitoalexinas o la lignina (Jones, 1984). En muchos casos, los fenoles son claves en la infección por parte de hongos patógenos, ya que su oxidación por parte de las enzimas polifenol-oxidasas forma quinonas que son tóxicas para los

hongos patógenos. Además, esta enzima es clave ya que está implicada en la síntesis de moléculas señal clave como el ácido salicílico (SA) de la ruta SAR (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996).

La síntesis de la PAL normalmente está reprimida en plantas no dañadas, produciéndose una síntesis *de novo* cuando la planta es atacada por un patógeno. Por tanto, los compuestos fenólicos se acumularían rápidamente durante la interacción patógeno-huésped y mediarían la supresión de la enfermedad mediante la inactivación de enzimas del hongo o mediante la formación de componentes estructurales de la pared celular (Isaac, 1992).

La PAL usa como sustrato fenilalanina para formar ácido cinámico, que actúa como precursor de los diferentes compuestos descritos anteriormente (fenoles, flavonoides, ligninas, etc). En nuestro caso, hemos analizado la actividad de la enzima midiendo la cantidad de ácido cinámico formado. Por tanto, podremos relacionar ésta actividad con la cantidad de PAL presente en las plantas de cada tratamiento. Para ello, se realizó una recta de calibrado con ácido cinámico, donde se interpolaron los datos de absorbancia anotados para nuestras muestras (Fig. 6A).

Según los resultados obtenidos, se detecta una actividad mayor respecto al control en las plantas tratadas con la menor concentración de Biolet, y, a medida que aumenta la concentración, la actividad de la PAL va disminuyendo. Este patrón se observa tanto en las plantas analizadas a las 24 horas como a 7 días post-inducción. Sin embargo, solo a los 7 días este aumento se consideró significativo (Fig. 6B). La actividad en plantas tratadas con 5 cc/L fue menor tanto en el control como en el resto de concentraciones en ambos intervalos de tiempo analizados.

Según diversos ensayos de hibridación *in situ*, el patrón de expresión génica de la PAL durante la infección con *P. infestans* muestra diferencias peculiares según el tiempo transcurrido tras la infección. Normalmente la enzima es inducida a las 8 horas después de la inoculación, tras lo que se vuelve a un patrón de expresión normal, y de nuevo vuelve a promoverse la expresión de la enzima a las 36 hpi. A partir de las 48 hpi se va reduciendo la expresión otra vez hasta niveles normales (Wang *et al.*, 2005). Este fenómeno pudo corroborarse también en las experiencias realizadas por Gayoso *et al.*, (2010). En estos experimentos se observó que la PAL presenta picos de actividad a las 8 hpi y 48 hpi en plantas de pimiento infectadas con *Verticillium dahliae*, dependiendo del grado de susceptibilidad al patógeno. Por tanto, se podría interpretar que los resultados obtenidos en nuestros ensayos son debido a que en las plantas tratadas el pico máximo de actividad de la PAL se habría producido a tiempos más tempranos que los reflejados en el presente trabajo.

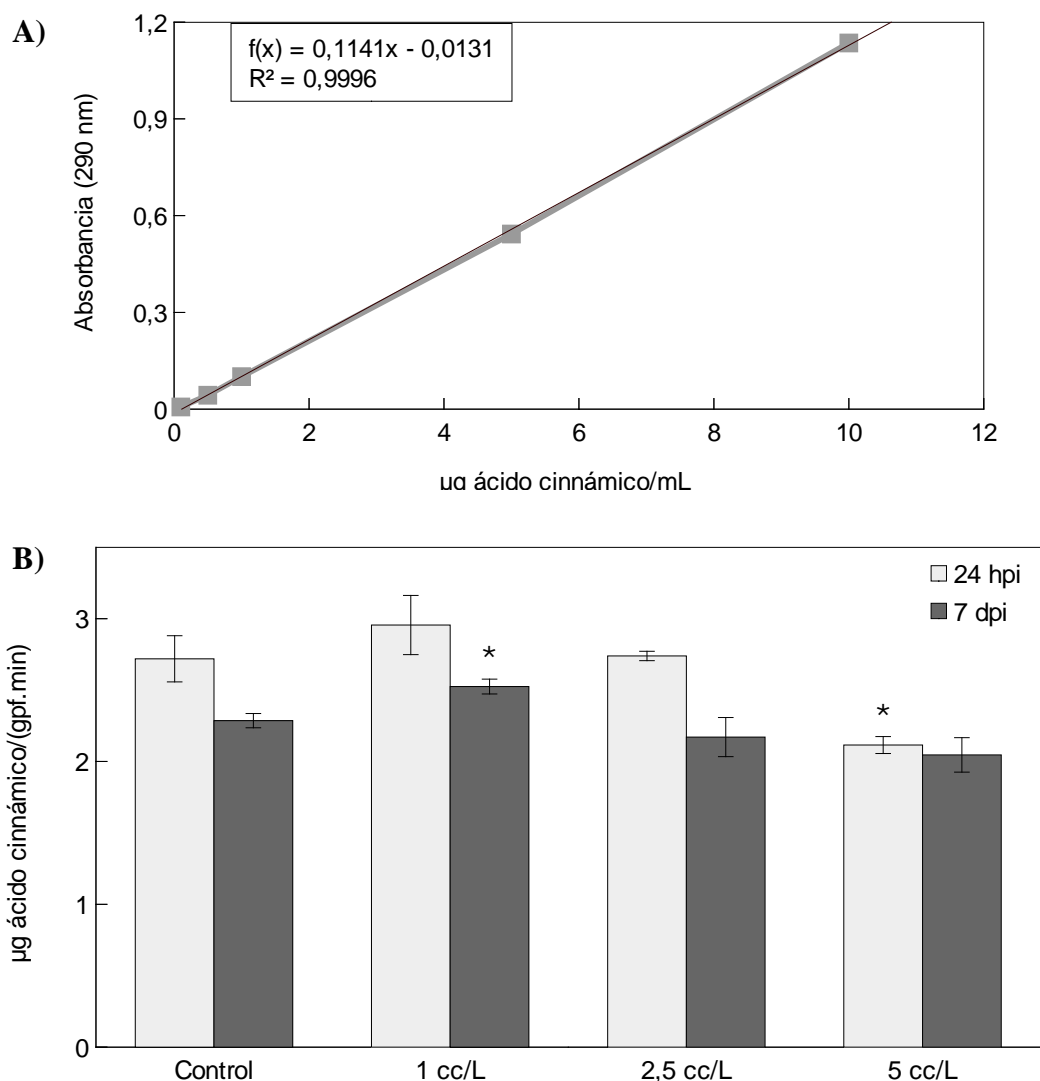


Figura 6. A) Recta de calibrado obtenida a 290 nm con distintas concentraciones de ácido cinnámico. **B)** Medida de la actividad PAL para los distintos tratamientos a 24 horas y a 7 días post-inducción. Los datos representan la media \pm SE de tres réplicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control para cada tiempo evaluado ($p < 0,05$).

Estos patrones de actividad enzimática de la PAL también podrían estar relacionados con el tipo elicitador que provoca la inducción de resistencia. Así, el Biolet, a pesar de influir sobre la expresión de algunos genes PR, podría no influir de manera directa en la ruta que afecta a la biosíntesis *de novo* de la PAL. La expresión de la enzima podría estar determinada, como se ha explicado antes, por interacciones de las proteínas de la cubierta del oomicete e interacciones célula-célula que se dan entre el patógeno y el huésped (Hammersmidt y Kuć, 1995). El inductor de resistencia no produce las mismas

condiciones que una infección por intrusión del patógeno en la planta, con lo cual no se activaría la cascada de señales responsable de la síntesis de la PAL, ya que no se necesitarían los compuestos fenólicos derivados para la producción de compuestos de pared responsables de frenar la infección.

La ausencia de un incremento claro de la actividad PAL en plantas tratadas con Biolet podría venir explicado también por un fenómeno de "priming" (Conrath *et al.*, 2006). En *Arabidopsis* se comprobó que la inducción de resistencia por una infección previa con *Pseudomonas syringae* prepara a los tejidos sistémicos para una posterior activación mejorada de las proteínas relacionadas con la defensa PR-1, PR-2 y PAL. Esta respuesta potenciada sólo es aparente tras la infección patogénica (Cameron *et al.*, 1999). El estado de "priming" también puede alcanzarse tras el tratamiento de la planta con un agente químico. Así, Kohler *et al.* (2002) demostraron que el pretratamiento de *Arabidopsis* con bajas dosis del inductor BTH llevó a una acumulación del mRNA de la PAL mayor que los niveles de expresión constitutiva tras la infección con *Pseudomonas syringae*. Según estas observaciones, los resultados obtenidos para la enzima PAL en nuestro ensayo se podrían considerar como un posible fenómeno de "priming". Al tratar nuestras muestras con Biolet los tejidos no muestran un aumento significativo de la actividad PAL, pero podrían adquirir el estado de "priming". Así, en trabajos anteriores se han observado evidencias de un fenómeno de "priming" en la expresión del mRNA de la PAL en respuesta a otros Oomicetos. Por ejemplo, el tratamiento de suspensiones de perejil con SA no indujo significativamente la expresión del gen PAL. Sin embargo, la infección posterior con el oomiceto *Phytophthora sojae* supuso un incremento considerable de los niveles de transcritos del gen PAL (Thulke y Conrath, 1998). Este fenómeno de "priming" en suspensiones de perejil se confirmó posteriormente con otros agentes inductores abióticos como INA o BTH (Katz *et al.*, 2002). Otras evidencias que apoyan esta hipótesis fueron obtenidas por Ortuño *et al.* (1997), quienes observaron que el tratamiento con Brotomax, un producto comercial que contiene lignosulfato de aluminio, resultó en un incremento considerable en los niveles de la fitoalexina escoparona en *Citrus* tras la infección posterior con *Phytophthora parasitica*. Ensayos similares detectaron un aumento en la acumulación de flavonona en *Citrus* en respuesta al tratamiento con Brotomax, indicando que el lignosulfato de aluminio puede provocar el estado de "priming" en las plantas (Fuster *et al.*, 1995). Este compuesto también está presente en la composición del Biolet, por lo que existen altas probabilidades de que este fenómeno se haya producido también en nuestros ensayos.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indicaron una reducción en el tamaño de las lesiones necróticas en las plantas tratadas con Biolet respecto a las plantas control. Esta reducción fue significativa para las concentraciones a 1cc/L y 5cc/L. La concentración intermedia de Biolet (2.5 cc/L) fue la menos efectiva a la hora de frenar las lesiones provocadas por el patógeno. Por lo tanto, el Biolet parece funcionar como un inductor de resistencia a *P. infestans* en plantas de tomate.

El gen de la proteína PR-1, que está involucrada en la respuesta defensiva de la planta frente al ataque de patógenos, mostró un pico máximo de expresión tanto a 24 horas como a 7 días tras el tratamiento con diferentes concentraciones de Biolet. Según nuestros resultados, el Biolet posee un modo de acción que se prolonga en el tiempo. Así, el producto ha mostrado una mayor inducción de la expresión de PR-1 a concentraciones altas en intervalos de tiempo cortos (24 horas), mientras que a concentraciones más bajas la expresión es mayor a intervalos de tiempo más amplios (7 días).

La actividad de la PAL cambió ligeramente tras la aplicación del Biolet, por lo que podemos concluir que este compuesto no induce de manera directa un aumento en la actividad de la enzima. Sin embargo, según otros trabajos consultados, esta ausencia de mayor actividad tras la inducción podría deberse a algún fenómeno de "priming" que se estuviese desarrollando en las plantas tratadas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Academic Press. EEUU.
- Amzalek, E. y Cohen, Y. (2007). Comparative efficacy of systemic acquired resistance-inducing compounds against rust infection in sunflower plants. *Phytopathology* (97), 179-186.
- Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S. y van Loon, L. C. (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of Genetics and Virology* (47), 79-89.
- Arasimowicz, M., Floryszak, J., Drzewiecka, K., Chmielowska, J., Abramowski, D. y Izbianska, K. (2013). Aluminum induces cross-resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Planta*. (239), 679–694.
- Bengtssona, T., Holeforsb, A., Witzellc, J., Andreassona, E. y Liljeroth, E. (2014). Activation of defence responses to *Phytophthora infestans* in potato by BABA. *Plant Pathology*. (63), 193–202.
- Cameron, R. K., Paiva, N. L., Lamb, C. J., y Dixon, R. A. (1999). Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato in *Arabidopsis*. *Physiology Molecular and Plant Pathology*. (55), 121-130.
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S. y Dong, X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*. (6), 1583-1592.
- Cohen, Y., Niderman, T., Mosinger, E., Fluhr, R. (1994). β -Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* (104), 59–66.
- Conrath, U., Beckers G. J. M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M., Pieterse C. M. J., Poinssot B., Pozo M. J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli, L. y Mauch-Mani B. (2006). Priming: get ready for battle. *The American Phytopathological Society*. 19 (10), 1062-1071.
- Cluzet, S., Torregrosa, C., Jacquet, C., Laftte, C., Fournier, J., Mercier, L., Salamagne, S., Briand, X., Esquerre-Tugaye, M.T y Dumas B. (2004). Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from the green alga *Ulva* spp. *Plant Cell and Environment*. (27), 917–928.
- Cutt, J.R., Klessig, D.F. (1992). Pathogenesis related proteins. In: Boller, T., Meins, F.(eds). *Genes involved in plant defense*. pp. 209-243. Springer. Vienna New York.
- Da Rocha, A. B. y Hammerschmidt, R. (2005). History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. *HorTechnology* (15), 518-528.
- Dangl, J. L. y Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* (411), 826-833.

- Delaney, T. P., Friedrich, L. y Ryals, J. A. (1995). Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (92), 6602-6606.
- Dick, M. W. (1990). Phylum Oomycota. En: *Handbook of Protozoa*. pp. 661-685 Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., y Chapman, D. J. (eds.). Boston: Jones & Bartlett Pub.
- Duijff, B.J., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C. y Lemanceau P. (1998). Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology*. (104), 903–910.
- Edreva A. (2004). A novel strategy for plant protection: Induced resistance. *Journal of Cell and Molecular Biology*. (3), 61-69.
- Fuster, M. D., García-Puig, D., Ortuño, A., Botía, J. M., Sabater, F., Porras, I., García-Lidón, A., Del Río, J. A. (1995). Selection of Citrus highly productive in secondary metabolites of industrial interest. Modulation of synthesis and/or accumulation processes. Páginas 81-85 en: *Current Trends in Fruit and Vegetable Phytochemistry*. García-Viguera C., Castañer, M., Gil, M. I., Ferreres, F. y Tomás-Barberán, F.A. Madrid: CSIC
- García-Brugger, A., Lamotte, O. y Vandelle, E. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19 (7), 711–724.
- Gayoso, M.C., Martínez de Ilarduya, O., Pomar, F., Merino, F. (2007). Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahlia* in different Solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology* (118), 199–209.
- Hermann, M., Maier, F., Masroor, A., Hirth, S., Pfitzner, A. J. P. y Pfitzner, U. M. (2013). The Arabidopsis NIMIN proteins affect NPR1 differentially. *Frontiers in Plant Science* doi: 10.3389/fpls.2013.00088.
- Isaac, S. (1992). *Fungal-Plant interactions*. London: Chapman & Hall.
- Jaulneau, V., Laitte, C., Corio-Costet, M. F., Stadnik, M. J., Salamagne, S., Briand, X., Esquerré-Tugayé, M. T. y Dumas, B. (2011). An *Ulva armoricana* extract protects plants against three powdery mildew pathogen. *European Journal of Plant Pathology* (131), 393-401.
- Jones, D. H. (1984) Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry* (23), 1349-1359.
- Jones, J. D. G. (2001). Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Current Opinion in Plant Biology* (4), 281-287.
- Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*. (444), 323-329.
- Katz, V., Fuchs, A. y Conrath, U. (2002). Pretreatment with salicylic acid primes parsley cells for enhanced ion transport following elicitation. *FEBS Lett.* (520), 53-57.
- Kamble, A., Koopmann, B. y von Tiedemann, A. (2013). Induced resistance to *Verticillium longisporum* in *Brassica napus* by β -aminobutyric acid. *Plant Pathology* (62), 552–561.

- Kliebenstein D. J. y Rowe, H. C. (2008). Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. *Plant Sciences* (174) 551–556.
- Kohler, A., Schwindling, S. y Conrath, U. (2002). Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves require the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiology*. (128), 1046-1056.
- Li, Z. T. y Gray, D. J. (2011). PR-1 gene family of grapevine: a uniquely duplicated PR-1 gene from a *Vitis* interspecific hybrid confers high level resistance to bacterial disease in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports* (30), 1–11.
- Liu, Q. y Xue, Q. (2006). Computational identification of novel PR-1-type genes in *Oryza sativa*. *Journal of Genetics* (85), 193–198.
- MAGRAMA (2010). *Anuario de estadística: estadísticas del medio rural*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid.
- Mauch-Mani, B. y Slusarenko, A. J. (1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* (8), 203-212.
- Melgarejo, P., García-Jimenez, J., Jordá, M.C., López, M.M., Andrés, M.F. y Duran, N. (2010). Patógenos de plantas descritos en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Mitsuhashi, I., Iwal, T., Seo, S., Yanagawa, Y., Kawahigasi, H., Hirose, S., Ohkawa, Y. y Ohashi, Y. (2008). Characteristic expression of twelve rice PR-1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (120/180). *Molecular Genetics and Genomics* (279), 415–427.
- Monjil, M.J., Takemoto, D. and Kawakita, K. (2013). Defense induced by a bis-aryl methanone compound leads to resistance in potato against *Phytophthora infestans*. *J Gen Plant Pathology*. (80), 38–49.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, A., Fritig, B. y Mosinger, E. (1995). Pathogenesis-Related PR-1 Proteins Are Antifungal. *Plant Physiology*. (108), 17-27.
- Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. y Staub, T. (2001). Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*. (107), 19–28.
- Ortuño, A., Botia, J. M., Fuster, M. D., Porrás, I., García-Lidón, A. y del Río, J. A. (1997). Effect of scoparone (6-7-dimethoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of tangelo Nova, *Citrus paradisi* and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. *J. Agric. Food Chem.*(45), 2740-2743.
- Panthee, D.R. y Cheng, F. (2010). Genomics of fungal disease resistance in tomato. *Current Genomics*. (11), 30-39.
- Pieterse, C. M. J., Van Wees, C. M., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J. y Van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* (10), 1571-1580.

- Pieterse, C. M. J. y van Loon, L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Science* (4), 52-58.
- Punja, Z. K. y Utkhede, R. S. (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology* (21), 400-407.
- Ramírez, V., Van der Ent, S., Garcia-Andrade, J., Coego, A., Pieterse, C. y Vera, P. (2010). OCP3 is an important modulator of NPR1-mediated jasmonic acid-dependent induced defenses in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* (10), 199.
- Ryu, C. M., Murphy, J. F., Mysore, K. S. y Kloepper, J. W. (2004). Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect Arabidopsis thaliana against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *Plant J.* (39), 381-392.
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, E.N., Kim, K.D., Hwang, B.K., Islam, R. y Shin J.S. (2005). Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports.* (24), 216–224.
- Schumann, G.L. y D'Arcy, C.J. (2000). Late blight of potato and tomato. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0724-01
- Shah, J., Tsui, F. and Klessig, D. F. (1997). Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of Arabidopsis thaliana, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* (10), 69-78.
- Silvar, C., Diaz, J., y Merino, F. (2005). Real-time polymerase chain reaction quantification of *Phytophthora capsici* in different pepper genotypes. *Phytopathology* (95), 1423–1429.
- Silvar, C., Merino F., y Díaz, J. (2009). Resistance in pepper plants induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* involves different defence-related genes. *Plant Biology* (11) 68–74.
- Steinberg, C.E.W. (2012). *Stress ecology: environmental stress as ecological driving force and key player in evolution*. Berlin: Springer.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. y Métraux, J.P. (1997). Systemic acquired resistance. *Ann. Rev. Phytopathology.* (35), 235-270.
- The Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* (485), 635-641.
- Thulke, O. y Conrath, U. (1998). Salicylic acid has a dual role in the activation of defense-related genes in parsley. *Plant Journal.* (14),35-42.
- Vallad, G. E. y Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agricultura. *Crop Science* (44), 1920-1934.
- Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T., Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reports* (12), 245–64.
- Van Loon, L.C., Rep, M. y Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Phytopathology.* (44), 135–62

Walters, D. R., Ratsep, J. y Havis, N.D (2014). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/ert026

Wang, B., Liu, J., Tian, Z., Song B. y Xie., C. (2005). Monitoring the expression patterns of potato genes associated with quantitative resistance to late blight during *Phytophthora infestans* infection using cDNA microarrays. *Plant Science*. (169), 1155–1167.