



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Caracterización de la respuesta de inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* Leon. en judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) por un cultivo esterilizado de Fo47

Caracterización da resposta de indución de resistencia a *Phytophthora capsici* Leon. en feixón (*Phaseolus vulgaris* L.) e pemento (*Capsicum annuum* L.) por un cultivo esterilizado de Fo47

Characterization of the response of induced resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and pepper (*Capsicum annuum* L.) by a sterilized culture of Fo47



MARTA LOIS ALVEDRO

Trabajo de fin de máster

Curso 2014/2015

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética



D. JOSÉ DÍAZ VARELA, PROFESOR TITULAR DE FISIOLoxÍA VEGETAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, Y D. JAVIER VELOSO FREIRE, PROFESOR CONTRATADO INTERINO DE SUSTITUCIÓN DE FISIOLoxÍA VEGETAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEXETAL E ECOLOXÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que el presente trabajo de Máster titulado

"Caracterización de la respuesta de inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* Leon. en judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) por un cultivo esterilizado de Fo47"

"Caracterización da resposta de indución de resistencia a *Phytophthora capsici* Leon. en feixón (*Phaseolus vulgaris* L.) e pemento (*Capsicum annuum* L.) por un cultivo esterilizado de Fo47"

"Characterization of the response of induced resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and pepper (*Capsicum annuum* L.) by a sterilized culture of Fo47"

y presentado por la graduada MARTA LOIS ALVEDRO ha sido realizado en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Animal, Biología Vexetal e Ecoloxía de la Universidade da Coruña bajo su dirección, y cumple con las condiciones exigidas para obtener el Máster de Biología Molecular, Celular y Genética, por lo que autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en A Coruña, a 19 de Junio de 2015.



Fdo. José Díaz Varela



Fdo. Javier Veloso Freire

Resumen

El agente de biocontrol *Fusarium oxysporum* Fo47 reduce los síntomas de diferentes enfermedades en plantas cultivadas. En este estudio se ha utilizado un cultivo esterilizado de Fo47 como elicitador para tratar plantas de pimiento y judía que posteriormente se inocularon con el patógeno *Phytophthora capsici*. El tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47 redujo significativamente los síntomas de la infección por *P. capsici* en ambas especies de plantas, tratándose de un fenómeno de resistencia inducida. En judía se determinó la actividad peroxidasa, una enzima clasificada como proteína PR implicada en la defensa de la planta frente a patógenos, además del contenido en compuestos fenólicos solubles totales y la abundancia de lignina. Las plantas de judía tratadas con el cultivo esterilizado de Fo47 y posteriormente inoculadas con *P. capsici* experimentaron un aumento significativo de la actividad peroxidasa; sin embargo, hubo una reducción significativa en compuestos fenólicos solubles totales y la ausencia de cambios en la abundancia de lignina. Se analizó el nivel de expresión de tres genes relacionados con la defensa en pimiento, *CABPR1*, *CASC1* y *CAPO1*. La expresión de *CABPR1* en las plantas de pimiento inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 no experimentó cambios significativos ni antes ni después de la inoculación con *P. capsici*, *CASC1* aumentó significativamente en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 e inoculadas con el patógeno, y *CAPO1* se redujo significativamente en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 en ausencia del patógeno. Estos resultados demuestran que el cultivo esterilizado de Fo47 provoca una respuesta en ambas especies de plantas cultivadas, lo que se traduce en una resistencia inducida frente a *P. capsici*.

Resumo

O axente de control biolóxico *Fusarium oxysporum* Fo47 reduce os síntomas de varias enfermidades en plantas cultivadas. Neste estudo utilizouse un cultivo esterilizado de Fo47 como elicitador para tratar plantas de pemento e feixón que posteriormente foron inoculadas co patóxeno *Phytophthora capsici*. O tratamento co cultivo esterilizado de Fo47 reduciu significativamente os síntomas da infección por *P. capsici* en ambas as dúas especies de plantas, constituíndo un fenómeno de resistencia inducida. En feixón determinouse a actividade peroxidasa, unha enzima clasificada como proteína PR implicada na defensa das plantas contra patóxenos, ademáis do contido en compostos fenólicos solubles totais e a abundancia de lignina. As plantas de feixón tratadas co cultivo esterilizado de Fo47 e posteriormente inoculadas con *P. capsici* experimentaron un aumento significativo na actividade peroxidasa; sen embargo, houbo unha redución significativa en compostos fenólicos solubles totais e a ausencia de alteracións na abundancia de lignina. Analizouse o nivel de expresión de tres xenes relacionados coa defensa de pemento, *CABPR1*, *CASC1* e *CAPO1*. A expresión de *CABPR1* nas plantas de pemento inducidas co cultivo esterilizado de Fo47 nos experimentou cambios significativos nin antes nin despois da inoculación con *P. capsici*. *CASC1* aumentou significativamente nas plantas inducidas co cultivo esterilizado de Fo47 e inoculadas co patóxeno, e *CAPO1* reduciuse significativamente nas plantas de pemento tratadas con cultivo esterilizado de Fo47 en ausencia do patóxeno. Estes resultados demostran que o cultivo esterilizado de Fo47 provoca unha resposta en ambas as dúas especies de plantas cultivadas, o que se traduce nunha resistencia inducida fronte a *P. capsici*.

Abstract

Fusarium oxysporum Fo47 is a biocontrol agent that reduces the symptoms of various diseases in cultivated plants. In this study we used a sterilized culture of Fo47 as elicitor for treating pepper and bean plants before inoculation with the pathogen *Phytophthora capsici*. Treatment with the sterilized culture of Fo47 reduced significantly the symptoms of the infection by *P. capsici* in both plants, being a phenomenon of induced resistance. In bean the peroxidase activity was measured; this enzyme is classified as a PR protein and is involved in plant defense against pathogens. In addition, the total soluble phenolic compounds and abundance of lignin was determined. Bean plants treated with the sterilized culture of Fo47 and then inoculated with *Phytophthora capsici* experienced a significant increase in the peroxidase activity; however, there was a significant reduction in total soluble phenolic compounds and the absence of changes in the abundance of lignin. The expression of three defense-related genes defense in pepper, *CABPR1*, *CASC1* and *CAPO1* was analyzed. *CABPR1* expression in pepper plants induced with the sterilized culture of Fo47 experienced no significant changes before or after inoculation with *Phytophthora capsici*. *CASC1* significantly increased in pepper plants induced with the sterilized culture of Fo47 and inoculated with pathogen. *CAPO1* was significantly reduced in pepper plants induced with sterilized culture of Fo47 in absence of the pathogen. These results show that the sterilized culture of Fo47 causes a response in both crop species, leading to an induced resistance against *P. capsici*.

Índice

	Página
1. Introducción	1
1.1. Enfermedades de las plantas	1
1.2. <i>Phytophthora capsici</i>	1
1.3. Huéspedes de <i>Phytophthora capsici</i> : <i>Capsicum annuum</i> L. y <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	6
1.4. Comunicación molecular planta-patógeno	7
1.5. Resistencia inducida	8
1.5.1. SAR e ISR.....	10
1.6. Aplicación práctica de hongos como inductores de resistencia: el caso de <i>Fusarium</i>	13
2. Objetivos	15
3. Material y métodos	15
3.1. Material vegetal	15
3.1.1. Judía	15
3.1.2. Pimiento	15
3.2. Material fúngico	16
3.2.1. Fo47.....	16
3.2.2. <i>Phytophthora capsici</i>	16
3.2.2.1. Obtención de inóculo de <i>Phytophthora capsici</i>	16
3.2.2.1.1. Judía	16
3.2.2.1.2. Pimiento.....	16
3.3. Método de tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47.....	16
3.4. Inoculación con <i>Phytophthora capsici</i>	17
3.4.1. Inoculación de las hojas de judía.....	17
3.4.2. Inoculación de las raíces de pimiento	17
3.5. Determinación de la actividad peroxidasa en judía	17
3.5.1. Toma de muestras y extracción de proteínas	17
3.5.2. Medida de la actividad peroxidasa	18
3.6. Determinación de fenoles solubles totales en judía	18
3.6.1. Toma de muestras y extracción de fenoles.....	18
3.6.2. Medida de fenoles totales.....	18

3.7. Determinación de lignina en judía	19
3.7.1. Extracción de paredes	19
3.7.2. Medida de la abundancia de ligninas.....	19
3.8. Estudio de la expresión génica en pimiento	19
3.8.1. Obtención de muestras	19
3.8.2. Extracción de RNA	20
3.8.3. Síntesis de cDNA.....	20
3.8.4. Medida de la expresión génica por qPCR (o PCR cuantitativa).....	20
3.9. Análisis estadístico	20
4. Resultados.....	21
4.1. Protección conferida por el tratamiento con Fo47 frente a <i>Phytophthora capsici</i>	21
4.1.1. <i>Phaseolus vulgaris</i>	21
4.1.2. <i>Capsicum annuum</i>	22
4.2. Efecto del tratamiento de Fo47 en la actividad peroxidasa de judía.....	23
4.3. Efecto del tratamiento de Fo47 en el contenido en compuestos fenólicos solubles totales de judía	24
4.4. Efecto del tratamiento de Fo47 en la abundancia de ligninas de judía	24
4.5. Expresión génica de <i>CABPR1</i> , <i>CASC1</i> y <i>CAPO1</i> en pimiento.....	25
5. Discusión	26
6. Conclusiones.....	32
7. Referencias	32

1. Introducción

1.1. Enfermedades de las plantas

Las plantas fijan la energía solar que coordina prácticamente todos los procesos vitales en la Tierra, constituyendo de forma directa o indirecta todo alimento del que dependen seres humanos y animales (Pieterse *et al.*, 2014). En la naturaleza, las plantas crecen bien siempre y cuando el suelo les proporcione los nutrientes suficientes y las condiciones de humedad, luz y temperatura sean las adecuadas; sin embargo, las plantas también enferman, creciendo y produciendo poco, y exhibiendo diferentes tipos de síntomas que a menudo conducen a la muerte de determinadas partes de la planta o de la planta entera (Agrios, 2004). Además de las condiciones medioambientales desfavorables, entre los agentes causantes de enfermedades y otros tipos de estrés en las plantas se encuentran múltiples patógenos y plagas, como virus, bacterias, hongos, oomicetos, protozoos, nematodos, insectos e incluso otras plantas (plantas parásitas) (Pieterse *et al.*, 2012; Veloso *et al.*, 2014). La gran importancia económica y alimentaria de los cultivos vegetales hace necesaria la adaptación de las plantas a todos estos estreses para lograr su supervivencia y propagación (Rasmann *et al.*, 2012).

Anualmente las enfermedades de las plantas provocan una reducción en la producción y/o causan la destrucción de un 14,1% de los cultivos a nivel mundial, lo que supone una pérdida de aproximadamente 220.000 millones de dólares al año; generalmente esta pérdida es menor en los países más desarrollados y mayor en aquellos en desarrollo, que necesitan mayor cantidad de alimento. El tipo y cantidad de pérdidas provocadas por enfermedades varían según la planta o producto vegetal, el patógeno, la localidad, el medio ambiente, las medidas de control utilizadas y la combinación de todos estos factores. Es de vital importancia el control de enfermedades de las plantas para evitar una reducción en la cantidad y calidad de los alimentos y la posible subida del precio de los mismos, de modo que el resultado sea una mayor cantidad de alimento de mejor calidad (Agrios, 2004).

En el presente trabajo fin de máster vamos a estudiar una estrategia de control de uno de los patógenos que causan más pérdidas a nivel mundial, el oomiceto *Phytophthora capsici* (Erwin & Ribeiro, 1996).

1.2. *Phytophthora capsici*

Los organismos tradicionalmente considerados como “hongos” se ubican actualmente en tres reinos distintos, Chromista, Protozoa y Fungi. *P. capsici* pertenece al reino Chromista, clase Oomycetes, orden Peronosporales y familia Pythiaceae (Hawksworth *et al.*, 1995). Las especies pertenecientes al género *Phytophthora* se clasifican en 10 clados principales; *P. capsici* pertenece al clado 2 (Blair *et al.*, 2008).

Los hongos verdaderos y los oomicetos constituyen el grupo más importante de agentes causantes de enfermedades en las plantas, pero *Phytophthora* y otros oomicetos tienen ciertas características biológicas que los diferencian de los hongos verdaderos: la mayor parte del ciclo vital es diploide y poseen zoosporas biflageladas, mientras que en los hongos verdaderos es fundamentalmente haploide o dicariótico; las paredes celulares de los hongos verdaderos están compuestas principalmente por quitina, quitosano y, en muchas especies, también por

glucano, mientras que las de los oomicetos están compuestas principalmente por β -1,3-glucano y celulosa (Cavalier-Smith, 1998; García-Jiménez *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010).

Phytophthora capsici fue descrito por primera vez en 1922 en plantaciones de pimiento en Nuevo Méjico (Leonian, 1922).

P. capsici es un patógeno altamente dinámico y destructivo. La enfermedad provocada por este patógeno ataca a un gran número de especies vegetales (Figura 1 y Tabla 1) provocando marchitez foliar y podredumbre de tallos, raíces y frutos (Kim *et al.*, 1997; Hausbeck & Lamour, 2004). La infección se caracteriza por una rápida expansión y por la presencia de lesiones necróticas y blandas (Figura 1) (Baysal *et al.*, 2005; Candole *et al.*, 2012; Kousik *et al.*, 2012). La enfermedad puede aparecer en cualquier etapa del ciclo de la planta, y los síntomas varían considerablemente en función de la especie vegetal, el área de infección y las condiciones ambientales (Baysal *et al.*, 2005; Lamour *et al.*, 2012). La edad de la planta o del fruto también afecta a la susceptibilidad a la enfermedad (la enfermedad suele ser más severa en las plantas y frutos más jóvenes y pequeños) (Granke *et al.*, 2012).

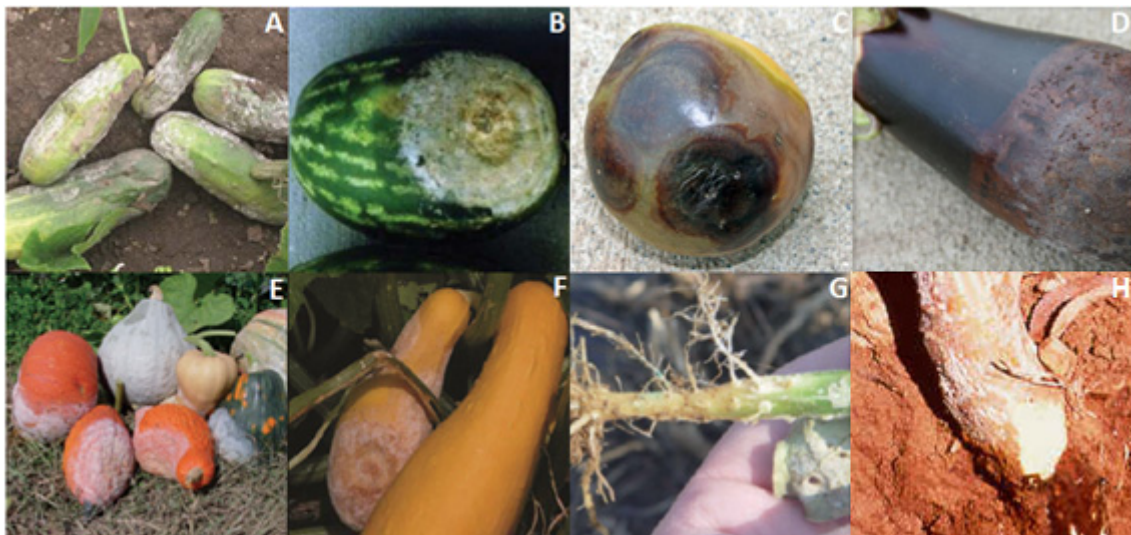


Figura 1. Síntomas provocados por *P. capsici* en diferentes huéspedes. Podredumbre del fruto en pepino (A), sandía (B), tomate (C), berenjena (D), calabaza (E) y calabacín (F); podredumbre radical en calabaza (G); Podredumbre de cuello en manzano (H). Imágenes tomadas de Granke *et al.*, 2012 (A, F), Gevens *et al.*, 2011 (B), Cornell University <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html> (C, D), Lamour *et al.*, 2012 (E, G) y Diseases of Urban Plants <http://ag.arizona.edu/pubs/diseases/az1124/#phyd> (H).

Tabla 1. Principales especies huésped de *P. capsici* (Erwin & Ribeiro, 1996; Gevens *et al.*, 2011; Lamour *et al.*, 2012; Granke *et al.*, 2012).

Familia	Nombre científico	Nombre común
Aloaceae	<i>Aloe</i> sp.	Aloe
Apiaceae	<i>Daucus carota</i> L.	Zanahoria
Brassicaceae	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Coliflor
	<i>Brassica rapa</i> L.	Nabo
	<i>Raphanus sativus</i> L.	Rábano
Caricaceae	<i>Carica papaya</i> L.	Papaya
Caryophyllaceae	<i>Dianthus barbatus</i> L.	Clavel
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i> L.	Remolacha
	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>	Acelga
	<i>Spinacia oleracea</i> L.	Espinaca
Cucurbitaceae	<i>Citrullus</i> sp.	Melón
	<i>Citrullus lanatus</i> Thunb.	Sandía
	<i>Cucumis sativus</i> L.	Pepino
	<i>Cucurbita máxima</i> Dcne.	Calabaza
	<i>Cucurbita pepo</i> L.	Calabacín
Ebenaceae	<i>Diospyros kaki</i> L.	Caqui
Fabaceae	<i>Medicago sativa</i> L.	Alfalfa
	<i>Phaseolus</i> sp.	Judía
	<i>Pisum sativum</i> L.	Guisante
	<i>Vicia faba</i> L.	Haba
Lauraceae	<i>Persea americana</i> L.	Aguacate
Liliaceae	<i>Allium cepa</i> L.	Cebolla
Linaceae	<i>Linum</i> sp.	Lino
Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Algodón
Moraceae	<i>Ficus carica</i> L.	Higo
Orchidaceae	<i>Vanilla planifolia</i> Andr.	Vainilla
Piperaceae	<i>Piper nigrum</i> L.	Pimienta
Proteaceae	<i>Macadamia ternifolia</i> L.	Nuez de Macadamia
Rosaceae	<i>Malus pumila</i> Mill.	Manzano
	<i>Prunus persica</i> L.	Melocotón
Rutaceae	<i>Citrus</i> spp.	Cítricos
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i> L.	Pimiento
	<i>Datura stramonium</i>	Estramonio
	<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.	Tomate
	<i>Nicotiana</i> sp.	Tabaco
	<i>Petunia</i> sp.	Petunia
	<i>Solanum melongena</i> L.	Berenjena
Sterculiaceae	<i>Theobroma cacao</i> L.	Cacao

P. capsici presenta un ciclo de vida con fase sexual y fase asexual (esto dificulta en gran medida el control de la enfermedad) y cuya mayor parte requiere la presencia de un huésped (Koç & Üstün, 2012; Lamour *et al.*, 2012). Aproximadamente la mitad de las 60 especies reconocidas del género *Phytophthora* son homotálicas; sin embargo, *P. capsici* es una especie heterotálica. Esto implica la necesidad del contacto directo de los dos tipos de compatibilidad (A1 y A2) para la reproducción sexual (Ko, 1988; Tyler, 2002). Cuando los micelios de A1 y A2 entran en contacto comienza la producción de los gametangios masculinos y femeninos (anteridios y oogonios, respectivamente), que se fusionan entre sí formando oosporas diploides capaces de persistir en el suelo durante años y resistir las condiciones ambientales desfavorables (Figura 2A, B). Las oosporas requieren cierto periodo de dormición, generalmente mayor a cuatro

semanas, para germinar y producir micelios sexualmente viables (Satour & Butler, 1968; Erwin & Ribeiro, 1996). Las oosporas germinan produciendo tubos germinales que se ramifican dando lugar al micelio típico y/o producen esporangios y largos pedicelos (Figura 2C) (Bowers *et al.*, 1990; Lamour & Hausbeck, 2003; García-Jiménez *et al.*, 2010; Jiménez-Díaz & Zabalgoeazcoa, 2010; Lamour *et al.*, 2012).

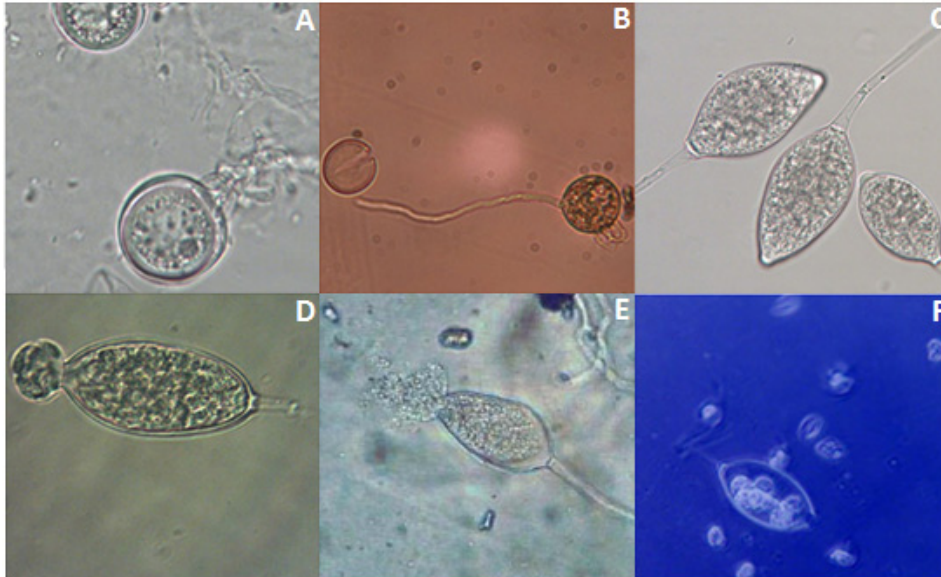


Figura 2. Estructuras reproductoras de *P. capsici*. (A) Oosporas; (B) Oospora empezando a germinar; (C) Esporangios; (D) Esporangio empezando a liberar las zoosporas que lleva en su interior; (E, F) Esporangio liberando las zoosporas. Imágenes tomadas de Cornell University <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html> (A, B, C, D, F) y Gevens *et al.*, 2011 (E).

Esta especie puede producir un elevado número de esporangios en la superficie del tejido afectado. En el interior de los esporangios se forman zoosporas biflageladas que se liberan al medio (Figura 2D, E, F) en condiciones de lluvia o eventos de riego, desplazándose por quimiotaxis hacia la planta y siguiendo un geotropismo negativo (Lamour *et al.*, 2012). En el caso de *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp. (familia *Pythiaceae*) la quimiotaxis parece ser una respuesta inespecífica a ciertos aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, metionina), y al etanol secretado por las raíces en anaerobiosis asociada con la saturación acuosa en el suelo (Hardham, 1992; Cooke & Whipps, 1993). No obstante, en la inmediata proximidad de la superficie radical la quimiotaxis de las zoosporas es mediada en parte por campos eléctricos, generados por las raíces como consecuencia de transporte iónico en su superficie, y las zoosporas son atraídas preferentemente por zonas anódicas o catódicas. El desplazamiento quimiotáctico finaliza con el enquistamiento de la zoospora, su adhesión a la superficie vegetal y la formación del tubo germinativo. La estimulación del enquistamiento da lugar a una serie de rápidos cambios estructurales en la zoospora, entre ellos la separación o retracción de los flagelos (Jiménez-Díaz & Zabalgoeazcoa, 2010; Lamour *et al.*, 2012). El material adhesivo está constituido fundamentalmente por glicoproteínas de alto peso molecular, y se encuentra almacenado en vesículas citoplásmicas localizadas periférica, central o dorsalmente en la zoospora, desde las cuales es liberado para recubrir el quiste en formación

(Hardham, 1992). El tubo germinativo, con la ayuda de enzimas secretadas, penetra en la cutícula de la planta directamente y coloniza los tejidos huésped (Feng *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Lamour *et al.*, 2012). En algunos casos pueden observarse apresorios en la zona de infección, estructuras especializadas para penetrar tejidos adultos intactos que proporcionan al patógeno adherencia a la superficie del huésped como preparación para la invasión subsiguiente (Jiménez-Díaz & Zabalgoeazcoa, 2010; Lamour *et al.*, 2012). *P. capsici* también puede infectar partes aéreas de la planta, como frutos y hojas. La penetración de la superficie de las hojas por *P. capsici* ocurre directamente o a través de aberturas naturales como los estomas (Hausbeck & Lamour, 2004).

La lluvia y el exceso de humedad en el suelo son los principales factores que contribuyen a la infección inicial y la propagación de *P. capsici* (Figura 3) (Bowers *et al.*, 1990; Bowers & Mitchell, 1990; Ristaino *et al.*, 1991; Ristaino, 1992; Ristaino *et al.*, 1993). Este oomiceto puede crecer a temperaturas de entre 7 y 37°C, pero una temperatura de 27-32°C es óptima para la producción de zoosporas y el proceso de infección. En condiciones óptimas de temperatura y alta humedad relativa el tiempo desde la infección hasta la esporulación es de 2-3 días, por lo que *P. capsici* puede afectar rápidamente a campos de cultivo enteros (Gevens *et al.*, 2011; Lamour *et al.*, 2012).

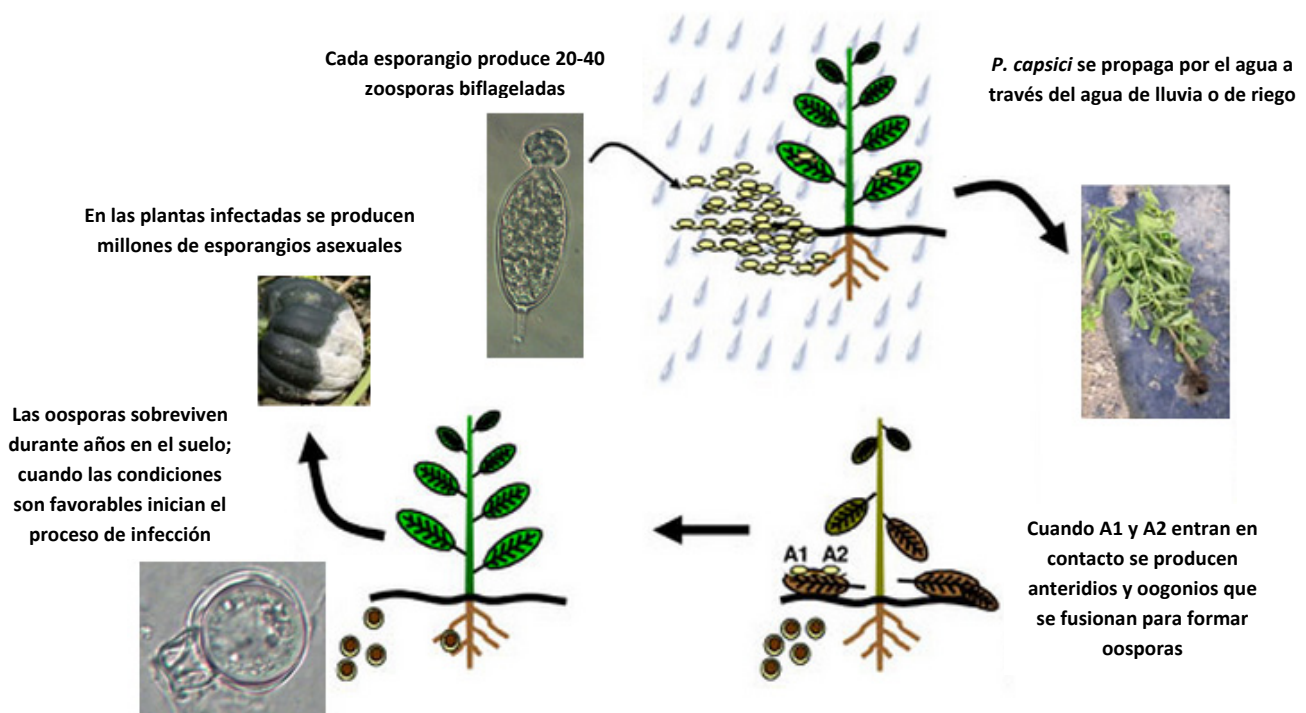


Figura 3. Ciclo de infección de *P. capsici*. Tomado y modificado de Cornell University <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html>.

P. capsici es considerado un organismo hemibiotrofo. La estrategia de infección de los hongos fitopatógenos hemibiotrofos se caracteriza por una fase inicial de crecimiento periplásmico y biotrófico de hifas intracelulares especializadas en la célula invadida, seguida por el desarrollo de hifas secundarias que necrosan los tejidos vegetales con antelación a su invasión (Jiménez-Díaz & Zabalgoeazcoa, 2010). En la primera fase *P. capsici* actúa como un organismo biotrofo y las células de la planta infectada no parecen estar afectadas; en la segunda fase *P. capsici*

actúa como un organismo necrotrofo, matando las células infectadas y causando necrosis y colapso tisular. El colapso tisular es seguido de la aparición de los esporangios, lo que proporciona los medios necesarios para la dispersión y el comienzo de un nuevo ciclo de infección (Lamour *et al.*, 2012). El periodo de tiempo que transcurre entre la fase biotrófica y la fase necrotrofica supone un problema para el agricultor, ya que en el momento de la cosecha parece no haber síntomas evidentes en los frutos (biotrofia) y cuando éstos son almacenados y llegan al mercado, los síntomas aparecen bien visibles (necrotrofia) (Hausbeck & Lamour, 2004; Lamour *et al.*, 2012). La expresión de los síntomas tras la cosecha se ve favorecida por el calor y las condiciones de alta humedad (Granke & Hausbeck, 2010).

1.3. Huéspedes de *Phytophthora capsici*: *Capsicum annum* L. y *Phaseolus vulgaris* L.

El pimiento (*Capsicum annum* L.) constituye uno de los cultivos vegetales de mayor importancia a nivel mundial. Perteneciente a la familia *Solanaceae*, su fruto puede ser consumido como vegetal fresco o bien deshidratado para su uso como especia (Zhang *et al.*, 2013; Choi & Hwang, 2015). Tiene gran importancia económica en la región de Galicia, donde el cultivar de mayor relevancia es Padrón (Pomar *et al.*, 2001; Veloso & Díaz, 2012). En el año 2013 se produjeron aproximadamente 999600 toneladas de pimiento en España (FAOSTAT 2015). Los cultivos de pimiento son atacados por diferentes patógenos que causan serias pérdidas en cuanto a producción. Una de las enfermedades más destructivas a nivel mundial es la conocida como “tristeza” del pimiento, causada por *P. capsici* (Figura 4A, B, C) (Hwang & Kim, 1995; Ristaino & Johnston, 1999; Lee *et al.*, 2001; Hausbeck & Lamour, 2004). Estrechamente relacionada con la alteración del equilibrio hídrico vegetal, los síntomas que caracterizan esta enfermedad son fundamentalmente la pérdida de turgencia de los tejidos (lo que se traduce en marchitamientos parciales o totales), la menor intensidad del color verde en los órganos aéreos y el menor desarrollo global de la planta (Palazón & Palazón, 1989). Se ha demostrado la presencia de *P. capsici* en cultivos de pimiento en diferentes zonas de España, especialmente en localidades mediterráneas como Tarragona, Valencia, Alicante y Murcia, pero Galicia es probablemente una de las zonas en las que más pérdidas ha provocado este patógeno (Bartual *et al.*, 1991; Pomar *et al.*, 2001).

P. capsici también ataca a la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Figura 4D, E, F) (Gevens *et al.*, 2008). La judía es una de las leguminosas de mayor importancia a nivel mundial cultivada ampliamente en el norte de España (Galicia y Asturias) por su alto valor de mercado y su buena composición nutricional, suponiendo una importante fuente de proteínas y calorías (Santalla *et al.*, 1999; Ocampo *et al.*, 2005; Olmedilla-Alonso *et al.*, 2013). En el año 2013 se produjeron aproximadamente 177600 toneladas de este cultivo en España (FAOSTAT, 2015).

Las notables pérdidas (tanto económicas como de producción) en estos cultivos por la acción de *P. capsici* hacen necesaria la búsqueda de un control integrado de la enfermedad provocada por este patógeno. Para ello, es fundamental profundizar en el conocimiento de la interacción entre estas dos especies vegetales y *P. capsici*.

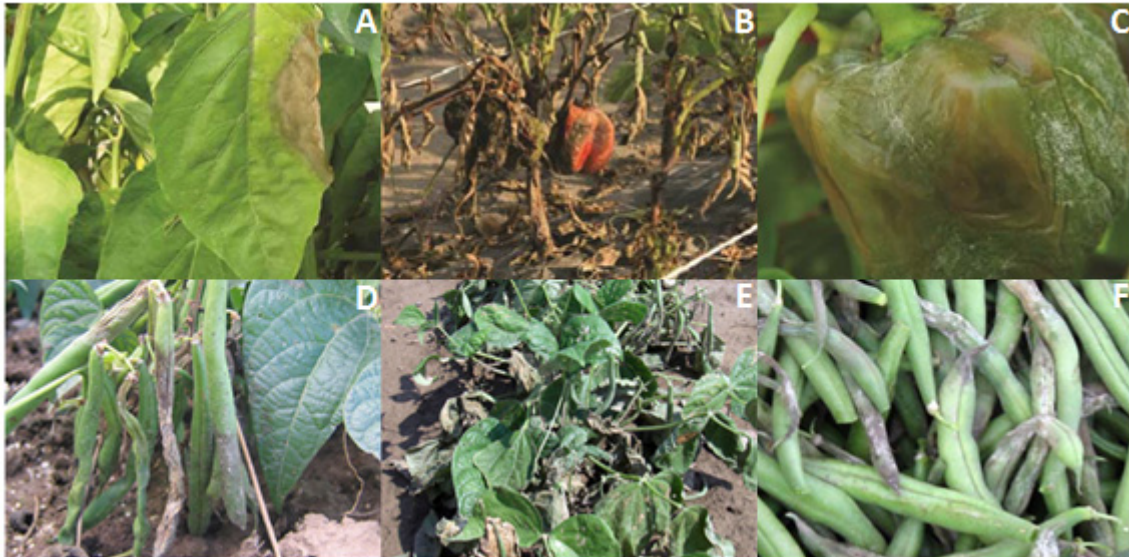


Figura 4. Efecto de *P. capsici* en pimiento (A, B, C) y judía (D, E, F). Imágenes tomadas de Granke *et al.*, 2012 (A, B, C) y Cornell University <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html> (D, E, F).

1.4. Comunicación molecular planta-patógeno

La mayoría de las plantas son resistentes ante el contacto directo con organismos potencialmente patógenos; estas interacciones son incompatibles y se denominan interacciones de no huésped, mientras que aquellas interacciones con plantas susceptibles al ataque de un patógeno se denominan interacciones de huésped (Van der Ent *et al.*, 2008).

Las plantas han sido capaces de desarrollar un sistema inmune inducible basado en el reconocimiento específico de moléculas derivadas de patógenos; el desarrollo evolutivo de este sistema se representa como un modelo en zig-zag (Figura 5) (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006). La activación de la defensa requiere el reconocimiento por parte de la planta de señales/moléculas producidas por el propio patógeno; estas señales son reconocidas por dos clases de receptores, los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, Pattern Recognition Receptors) y las proteínas R (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010). En una primera fase, los PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) o MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns) son reconocidos por los PRRs activándose la conocida como inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI; PAMP-triggered immunity). Los PRRs también reconocen señales endógenas vegetales que surgen del daño causado por la infección patogénica (DAMPs; Damage Associated Molecular Patterns) (Jones & Dangl, 2006). Para superar esta primera línea de defensa, el patógeno desarrolla efectores que son secretados en la interfaz del patógeno con la célula vegetal, evitando la detección de PAMPs por el huésped o suprimiendo la señalización de la PTI (Abramovitch & Martin, 2004; De Jonge *et al.*, 2010; Bardoel *et al.*, 2011; Pieterse *et al.*, 2012). Se produce así la llamada susceptibilidad activada por efectores (ETS; effector-triggered susceptibility) (Glazebrook *et al.*, 2003; Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006). En una segunda línea de defensa vegetal las proteínas R median el reconocimiento de la acción específica de estos efectores, resultando en la conocida como inmunidad desencadenada por efectores (ETI, effector-triggered immunity); se trata de una respuesta acelerada y amplificadora de la PTI que resulta en la resistencia a la enfermedad y está

asociada generalmente con la respuesta hipersensible (HR), una forma de muerte celular programada vegetal en los sitios de infección que implica el aumento de la expresión de genes de defensa (Díaz *et al.*, 2002). La HR limita al patógeno al lugar inicial de la infección, restringiendo así su crecimiento y propagación (Stall *et al.*, 2009). En una última fase, la selección natural conduce a que el patógeno evite la ETI, por ejemplo, desarrollando nuevos efectores que supriman la ETI (Jones & Dangl, 2006). Numerosos estudios han demostrado que la ETI y la PTI utilizan un conjunto de componentes de señalización que incluyen múltiples proteínas reguladoras, especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) y fitohormonas como el ácido salicílico (SA), etileno (ET) y ácido jasmónico (JA) (Nimchuk *et al.*, 2003; Glazebrook, 2005; Spanu, 2012). Generalmente los niveles de estas fitohormonas y de ROS aumentan en los tejidos vegetales tras la infección por el patógeno (Pieterse *et al.*, 2012).

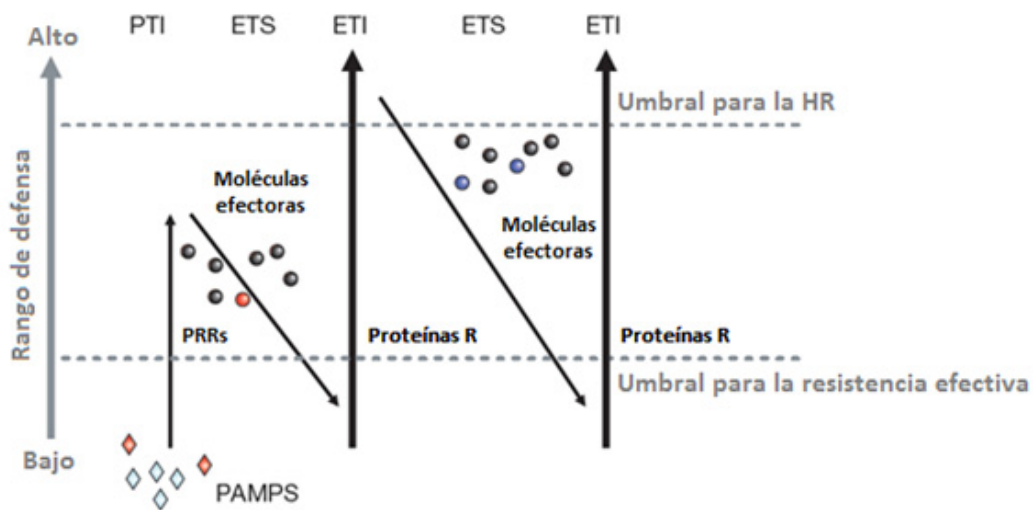


Figura 5. Ilustración del modelo en zig-zag del sistema inmune vegetal. Tomado y modificado de Jones & Dangl (2006).

La PTI, y la ETI constituyen respuestas locales transitorias limitadas a los tejidos infectados por patógenos. Sin embargo, las plantas pueden activar una inmunidad sistémica de larga duración; esta inmunidad sistémica puede ser iniciada por interacciones compatibles o incompatibles locales que resultan en la resistencia sistémica adquirida (SAR) o en la resistencia sistémica inducida por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR-ISR) (Pieterse *et al.*, 1998; van Wees *et al.*, 2000).

1.5. Resistencia inducida

Las defensas vegetales pueden ser constitutivas o inducidas (defensa pasiva o activa respectivamente) (Lucas, 1998). Estas defensas pueden ser estructurales, como por ejemplo capas gruesas de cutícula, tricomas, depósitos de lignina, suberina o calosa en la pared celular vegetal, o químicas, basadas en la acumulación de sustancias tóxicas en la célula vegetal tales como compuestos fenólicos, fitoalexinas o proteínas PR (“Pathogenesis-Related proteins”) (Van der Ent *et al.*, 2008).

La resistencia inducida constituye una de las estrategias más prometedoras en el control de los agentes patógenos de plantas. La resistencia inducida es una forma de defensa activa que

involucra la expresión diferencial de genes y cambios metabólicos. En los últimos años ha habido un gran número de estudios destinados a comprender cuál es la mejor forma de emplear esta estrategia para lograr la protección de cultivos (Walters *et al.*, 2013). La resistencia inducida confiere protección frente a una amplia gama de patógenos y plagas, como hongos, bacterias, virus, nematodos, plantas parásitas e insectos herbívoros (Sticher *et al.*, 1997; Benhamou & Nicole, 1999; Walling, 2000; Kessler & Baldwin, 2002), y puede ser inducida por una amplia gama de agentes bióticos y abióticos (Tabla 2) (da Rocha & Hammerschmidt, 2005; Lyon, 2007; Walters *et al.*, 2013).

Tabla 2. Ejemplos de elicitores y agentes inductores de resistencia con demostrada capacidad de control de enfermedades de plantas (tomado y modificado de Walters *et al.*, 2013).

Tipo de elicitor/ inductor de resistencia	Planta protegida	Patógeno	Referencia
Inductores biológicos			
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal			
<i>Ochrobactrum lupine/</i>	Pimiento	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Hahm <i>et al.</i> (2012)
<i>Novosphingobium pentaromativorans</i>			
<i>Azospirillum brasilense</i> REC3	Fresa	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Tortora <i>et al.</i> (2012)
<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	Fresa	<i>Sphaerotheca macularis</i>	Lowe <i>et al.</i> (2012)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	Weller <i>et al.</i> (2012)
Hongos promotores del crecimiento vegetal			
<i>Fusarium equiseti</i>	Pepino	<i>Colletotrichum orbiculare</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Saldajeno & Hyakumachi (2011) Saldajeno & Hyakumachi (2011)
Hongos de biocontrol y sus elicitores			
<i>Trichoderma asperellum</i> SKT-1	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	Yoshioka <i>et al.</i> (2012)
<i>T. harzianum</i> T39	Vid	<i>Plasmopara viticola</i>	Perazzolli <i>et al.</i> (2011)
<i>T. harzianum/T. atroviride</i>	Tomate	<i>Botrytis cinerea</i>	Tucci <i>et al.</i> (2011)
<i>T. atroviride</i>	Pino	<i>Diplodia pinea</i>	Reglinski <i>et al.</i> (2012)
<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47	Pimiento	<i>Phytophthora capsici/Verticillium dahliae</i>	Veloso & Díaz (2012)
Elicitor de Fo47	Judía	<i>Phytophthora capsici</i>	Lois (2014)
Hongos micorrícicos arbusculares			
<i>Glomus intraradices</i>	Arroz	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Campos-Soriano <i>et al.</i> (2012)
<i>Glomus mosseae</i>	Maíz	<i>Rhizoctonia solani</i>	Song <i>et al.</i> (2011)
Endófitos			
<i>Piriformospora indica</i>	Cebada	<i>Blumeria graminis f.sp. hordei</i>	Molitor <i>et al.</i> (2011)
Extractos de algas			
<i>Ulva armoricana</i>	Judía/vid/ pepino	<i>Erysiphe polygoni, Erysiphe necator, Sphaerotheca fuliginea</i>	Jaulneau <i>et al.</i> (2011)
<i>Ulva lactuca</i>	Tomate	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>	El Modafar <i>et al.</i> (2012)
Inductores químicos y no biológicos			
Acibenzolar-S-metil (ASM)	Calabacín Haba Tomate	<i>Phytophthora capsici</i> <i>Uromyces viciae-fabae</i> <i>Ralstonia solanacearum</i>	Ji <i>et al.</i> (2011) Sillero <i>et al.</i> (2012) Hong <i>et al.</i> (2011) Abo-Elyousr <i>et al.</i> (2012) Myresiotis <i>et al.</i> (2012)
		<i>Fusarium oxysporum f.sp. radidis-lycopersici</i> <i>Xanthomonas</i> spp.	
Ácido β -aminobutírico (BABA)	Tomate	<i>Phytophthora infestans</i>	Huang <i>et al.</i> (2012) Sharma <i>et al.</i> (2012)
Fosfito potásico	<i>Arabidopsis</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Eshraghi <i>et al.</i> (2011)
Carbón vegetal (Biochar)	Tomate	<i>Botrytis cinerea</i>	Elad <i>et al.</i> (2010)
	Espárrago	<i>Fusarium oxysporum/F. proliferatum</i>	Elmer & Pignatello (2011)

Originalmente el término elicitor se utilizaba para designar a aquellas moléculas capaces de inducir la producción de fitoalexinas; actualmente comprende todo aquel compuesto capaz de estimular cualquier tipo de defensa vegetal (Ebel & Cosio, 1994; Hahn, 1996; Nürnberger, 1999). Esta definición más amplia incluye tanto sustancias de origen patógeno como compuestos liberados por las plantas debido al ataque del mismo (Boller, 1995; Ebel & Cosio, 1994). Los elicitores no tienen una estructura química común (pueden ser oligosacáridos, péptidos, proteínas y lípidos) y se clasifican en generales (desencadenan respuestas de defensa en plantas huéspedes y no huéspedes) y específicos de raza (inducen respuestas de defensa que conducen a la resistencia a la enfermedad sólo en los cultivares con resistencia específica de huésped) (Montesano *et al.*, 2003). Los primeros elicitores fúngicos proteicos caracterizados forman parte de una pequeña familia de holoproteínas secretoras altamente conservadas de 10 kD, las elicitinas. Las elicitinas son secretadas por diversas especies de *Phytophthora*, induciendo resistencia en tabaco y otras plantas (Ricci *et al.*, 1989; Bonnet *et al.*, 1996).

Los elicitores son capaces de desarrollar resistencia inducida en la planta; entre las respuestas de resistencia inducida se han caracterizado bastante bien dos: la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR).

1.5.1. SAR e ISR

La SAR es una respuesta inducida en los tejidos distales al lugar de infección que implica la propagación de señales a larga distancia que confieran una capacidad defensiva mejorada en aquellas partes de la planta que todavía se encuentran en buen estado (Figura 6) (Dempsey & Klessig, 2012; Shah & Zeier, 2013). Está asociada a un aumento local y sistémico del nivel de ácido salicílico (SA) y a un aumento en la expresión de proteínas PR, proteínas de la planta huésped cuya expresión se induce en situaciones de patogénesis o en situaciones relacionadas (Vernooij *et al.*, 1994; Hammerschmidt, 1999; van Loon, 1999; Vallad & Goodman, 2004). Aunque el mayor interés de estas proteínas reside en su función en la respuesta de defensa de las plantas, se sabe que también participan en otros procesos fisiológicos del desarrollo de la planta, incluyendo la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico, la fertilización, la embriogénesis, la maduración del fruto, y la germinación de la semilla y la movilización de las reservas del endospermo en semillas de cereales (San-Segundo & Coca, 2004).

En la SAR el SA se acumula primero en el lugar de infección y posteriormente en los tejidos y órganos distales (Jung *et al.*, 2009). Se han descubierto varios metabolitos implicados en la señalización a larga distancia de la SAR: MeSA (salicilato de metilo), el diterpenoide DA (dehidroabietinal), un factor dependiente de G3P (glicerol-3-fosfato), AzA (ácido azelaico), y Pip (ácido pipercolico) (Pieterse *et al.*, 2014). Es necesaria la formación de MeSA en el lugar de la infección (nivel local) y la conversión del MeSA en SA a nivel sistémico para generar la SAR (Park *et al.*, 2007).

La ISR es otro tipo de respuesta inducida que conduce a resistencia generalizada. Es desencadenada por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y por algunos hongos como *Penicillium simplicissimum* o *Trichoderma* sp. (Walters *et al.*, 2013). A diferencia de la SAR, la inducción de ISR no está asociada a la acumulación de SA y proteínas PR; está mediada por rutas de señalización dependientes del ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) (Figura

6) (Van Wees *et al.*, 2000; Nuez *et al.*, 2004; Vallad & Goodman, 2004; Gutiérrez & de la Torre-Almaraz, 2007). La PGPR-ISR ha demostrado ser eficaz contra el ataque de patógenos necrotrofos e insectos herbívoros (Van Wees *et al.*, 2008; Pineda *et al.*, 2010). Ciertos cambios bioquímicos característicos de las plantas que expresan ISR se hacen evidentes sólo en respuesta a la infección por el patógeno y sólo en partes de la planta donde se requiere una resistencia efectiva. Este fenómeno ha sido descrito como “priming”; es la respuesta vegetal más común contra el estrés biótico y abiótico y se traduce en una respuesta más rápida y fuerte al ataque del patógeno (Sticher *et al.*, 1997; Conrath *et al.*, 2001; Bruce *et al.*, 2007; Goellner & Conrath, 2008).

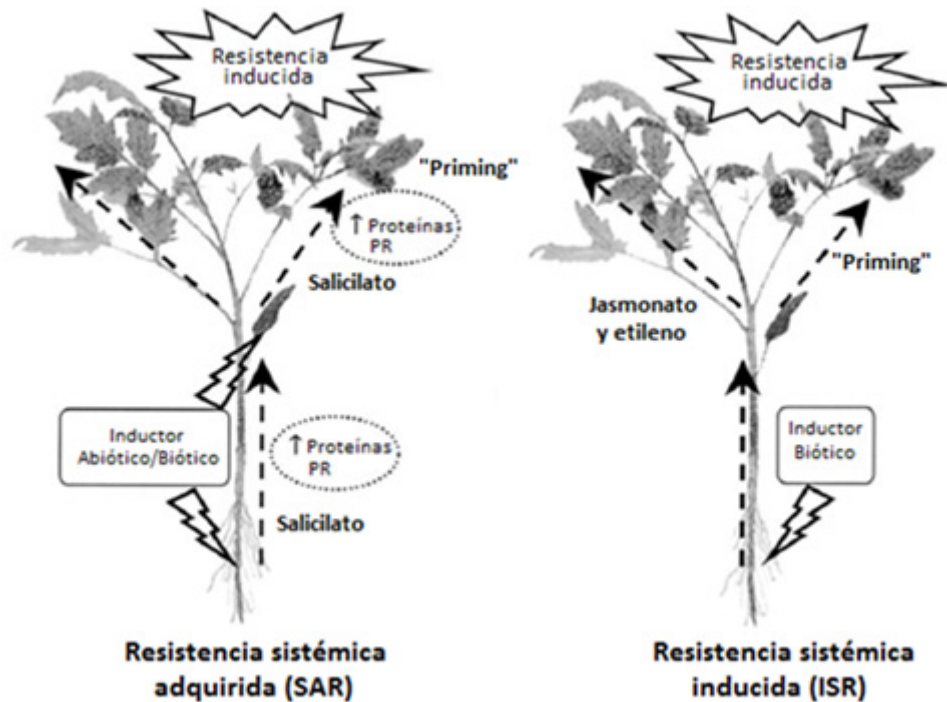


Figura 6. Comparación gráfica entre SAR e ISR. La flecha discontinua indica la transmisión de una señal por el floema. Tomado y modificado de Vallad & Goodman (2004).

Las diferencias entre la ruta ISR y la ruta SAR son debidas a la activación de la proteína NPR1 (Non-Expressor of PR), que es capaz de distinguir entre la presencia de rizobacterias o de SA en la planta para producir dos tipos de respuesta, o bien activar la expresión de genes PR que desencadenan la respuesta de tipo SAR o ISR (García-Mas *et al.*, 2004).

NPR1 constituye un regulador central de la SAR; relacionado con la vía de señalización del SA para la inducción de genes de defensa), NPR1 regula la expresión de genes de defensa a través de la interacción con los factores de transcripción TGA (Dong, 2004; Gatz, 2012; Fu & Dong, 2013). Se ha propuesto que la actividad de NPR1 está controlada por las proteínas de unión a SA NPR3 y NPR4, que funcionan como receptores del SA y pueden unirse físicamente a NPR1 en función de la concentración de esta hormona. NPR4 se uniría a NPR1 en ausencia de SA, mientras que NPR3 requiere SA para unirse a NPR1 (NPR4 tiene una alta afinidad por el SA y NPR3 una baja afinidad) (Fu *et al.*, 2012). NPR3 controlaría la activación de la HR en el sitio de infección y NPR4 controlaría la activación de genes de defensa en los tejidos circundantes y

distales. Sin embargo, NPR1 también es capaz de unirse al SA independientemente de NPR3 y NPR4 y de responder a interacciones con este ligando mediante cambios conformacionales, por lo que se ha propuesto que NPR1 sería por sí mismo un receptor de SA (Wu *et al.*, 2012).

El fenómeno de “priming” también se ha observado durante la expresión de SAR en plantas tratadas con productos químicos agonistas del SA o inoculadas con diferentes patógenos (Figura 7) (Goellner & Conrath, 2008; Luna & Ton, 2012). Cuando las plantas se exponen al patógeno durante largos períodos de tiempo el efecto de “priming” puede ser transmitido a la progenie y responder ante un estrés biótico de forma similar a la de sus progenitores (Luna & Ton, 2012; Slaughter *et al.*, 2012). Los mecanismos epigenéticos implicados en este “priming” transgeneracional implicarían modificaciones de histonas (metilación, acetilación, SUMOilación, fosforilación), cambios en la metilación del DNA y modificaciones de la cromatina (Jung *et al.*, 2012; Pastor *et al.*, 2013). NPR1 sería un factor clave para el establecimiento del “priming transgeneracional”; al ser un posible receptor del SA, la percepción y señalización del SA sería fundamental para la consecución del “priming” transgeneracional (Veloso *et al.*, 2014).

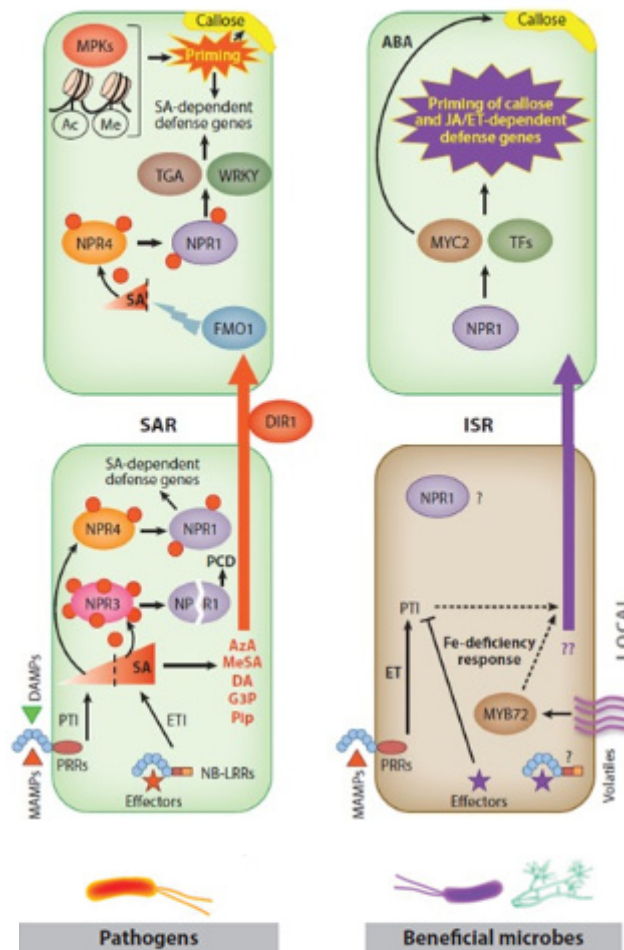


Figura 7. Representación esquemática de los mecanismos y componentes moleculares implicados en la SAR e ISR. Tomado y modificado de Pieterse *et al.* (2014).

La ISR no es dependiente de SA y no se asocia a la expresión de proteínas PR antes del ataque del patógeno, por lo que la función de NPR1 en esta forma de resistencia inducida se desconoce todavía (Van der Ent *et al.*, 2008). Un importante regulador transcripcional de “priming” durante la ISR es el factor transcripcional MYC2 (Fig. 7) (Pozo *et al.*, 2008; Stein *et al.*, 2008). Otras proteínas de señalización implicadas en este fenómeno son las MAPKs (mitogen-activated protein kinases) (Pieterse *et al.*, 2014). Durante este fenómeno se produce una mayor deposición de calosa (barreras estructurales) cuya regulación está mediada por el ácido abscísico (ABA) (Fig. 7).

1.6. Aplicación práctica de hongos como inductores de resistencia: el caso de *Fusarium*

El uso de hongos en la inducción de resistencia está bien documentado (Punja & Utkhede, 2003). *Fusarium* representa un extenso género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo, y la mayoría de las especies descritas pertenecientes a este género son saprófitas. *Fusarium oxysporum* incluye un significativo número de patógenos de plantas capaces de inducir necrosis o marchitez en cultivos de gran importancia económica (Olivain *et al.*, 2006).

El uso de una cepa patógena de *Fusarium* en una planta que no es su huésped puede desencadenar resistencia inducida; además, la PTI en la planta generalmente es más fuerte que en el caso de las cepas patógenas (Fravel *et al.*, 2003). Se han ensayado diferentes cepas de *Fusarium oxysporum* como agentes inductores de resistencia, algunas de ellas no patógenas (Fuchs *et al.*, 1997; Duijff *et al.*, 1998; Larkin & Fravel, 1999; He *et al.*, 2002; Elmer, 2004), y en otros casos *formae speciales* capaces de infectar otros huéspedes (Biles & Martyn, 1989; Huertas-González *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta la estrecha especificidad de huésped de las cepas patógenas, la ausencia de patogenicidad en ciertas especies de plantas puede ser simplemente una consecuencia de incompatibilidad con una planta no huésped, que podría ser suficiente para inducir respuestas de defensa en la planta y protegerla contra ataques posteriores de otros patógenos. La colonización por una cepa no patógena o patógena implica diferencias en la respuesta de defensa vegetal; estas diferencias pueden ser debidas a PAMPs (o MAMPs) o a la existencia de efectores específicos que modulan la respuesta de defensa (Vos *et al.*, 2014). Por otra parte, en algunos casos *F. oxysporum* no sólo induce resistencia, sino que también funciona compitiendo con el patógeno (por ejemplo, con *Fusarium* spp.), confiriendo así una protección adicional (Fravel *et al.*, 2003).

El tratamiento de sandía con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* induce resistencia sistémica contra determinados patógenos aéreos (Biles & Martyn, 1989). La resistencia de *Asparagus densiflorus* a *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* se correlaciona con la inducción de la HR y el aumento de la actividad peroxidasa y PAL (He *et al.*, 2001). El uso de cepas no patógenas de *F. oxysporum* indujo SAR en *A. officinalis* contra la cepa patógena *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*. Esta resistencia inducida se asoció con la activación de enzimas relacionadas con la defensa y la acumulación de lignina, junto con la sobreexpresión de genes de respuesta a SA (He *et al.*, 2002); la participación de una vía de señalización dependiente de SA se confirmó mediante el uso de inhibidores de la biosíntesis de SA (He & Wolyn, 2005). El aumento de la actividad peroxidasa y PAL y la acumulación de lignina constituyen componentes clave en la resistencia a la enfermedad local y sistémica (Kombrink & Somssich, 1995). La actividad PAL se asocia con la

biosíntesis de metabolitos tóxicos tales como fitoalexinas, fenoles, ligninas y SA en las vías de defensa vegetales (Mauch-Mani & Slusarenko, 1996). *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (patógena en tomate) es capaz de proteger a pimiento contra *Verticillium dahliae*, *Phytophthora capsici* y *Botrytis cinerea* e induce un incremento en los niveles de compuestos fenólicos. Al proteger frente a patógenos del suelo y también aéreos, la respuesta inducida por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* es tanto local como sistémica, así como no específica (Díaz *et al.*, 2005). Varios estudios han tratado de identificar los elicitores específicos que producen tales respuestas de defensa con el fin de evitar el uso del hongo vivo; un extracto crudo esterilizado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* confirió protección a pimiento contra *B. cinerea* e indujo la expresión de varios genes de defensa vegetales (Veloso & Díaz, 2013). La protección conferida por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* implica la activación de diferentes genes relacionados con la defensa (Silvar *et al.*, 2009). Los compuestos fenólicos se relacionan con varias funciones implicadas en la defensa vegetal, es decir, barreras físicas y químicas preformadas o inducibles contra agentes patógenos y señalización local y sistémica para la expresión de genes de defensa (Dixon *et al.*, 2002). Tamietti *et al.* (1993) también observaron un aumento en los niveles de compuestos fenólicos en plantas de tomate inoculadas con cepas no patógenas de *Fusarium*.

El uso de cepas no patógenas de *F. oxysporum* constituye una buena estrategia de control biológico para proteger a la planta de una infección posterior con una cepa patógena capaz de provocar enfermedades vasculares (fusariosis) (Aimé *et al.*, 2008). Las respuestas de defensa vegetal son más frecuentes e intensas tras la inoculación con una cepa de control biológico que con una cepa patógena (Olivain & Alabouvette, 1999; Olivain *et al.*, 2003). La cepa no patógena *Fusarium oxysporum* 47 (Fo47), aislada de un suelo supresivo de la fusariosis, ha demostrado ser un eficaz agente de control biológico induciendo respuestas de defensa en varios cultivos, entre ellos tomate (Fuchs *et al.*, 1997), guisante (Benhamou & Garand, 2001), pepino (Benhamou *et al.*, 2002) y pimiento (Veloso & Díaz, 2012). Este aislado es especialmente eficaz contra enfermedades radicales provocadas por cepas patógenas de *F. oxysporum*; es capaz de colonizar las capas más externas de la raíz desencadenando varias respuestas inducidas que previenen la colonización (Benhamou & Garand, 2001; Benhamou *et al.*, 2002; Fravel *et al.*, 2003; Alabouvette *et al.*, 2009). Fo47 emplea diferentes mecanismos de acción para generar su capacidad de control biológico, entre ellos la competencia por nutrientes en el suelo, la competencia por la colonización de la raíz y la resistencia inducida (Olivain *et al.*, 2006). Aimé *et al.* (2013) demostraron que, además de la competencia por nutrientes, el fenómeno de *priming* es uno de los mecanismos por los que Fo47 controla la fusariosis en tomate, uno de los cultivos de mayor interés económico. La protección conferida a la planta por Fo47 es siempre mejor cuando este hongo se aplica un par de días antes de la inoculación con el patógeno (Olivain *et al.*, 1995). Duijff *et al.* (1998) sugirieron que la resistencia inducida por Fo47 puede actuar a través de un mecanismo de tipo SAR clásico, ya que induce la expresión de proteínas PR; sin embargo, también se ha sugerido un mecanismo de tipo ISR para este hongo de biocontrol (Vos *et al.*, 2014).

El trabajo previo realizado en nuestro laboratorio demostró que un cultivo esterilizado de Fo47 inducía resistencia en judía contra *P. capsici*; las plantas de judía tratadas con dicho cultivo mostraban una mayor actividad β -1,3-glucanasa tras la inoculación con *P. capsici* (Lois, 2014). En el presente trabajo se ha analizado la actividad peroxidasa junto con la abundancia de

lignina y la producción de compuestos fenólicos solubles totales asociados a la defensa de las plantas de judía en respuesta a un cultivo esterilizado de Fo47.

Castro (2014) demostró en el mismo laboratorio que un extracto crudo de Fo47 inducía resistencia en pimiento contra el patógeno necrotrofo *Botrytis cinerea*; las plantas tratadas con el extracto crudo de Fo47 mostraban una mayor actividad peroxidasa y β -1,3-glucanasa y un mayor nivel de expresión en las hojas del gen *CABPR1*, una proteína PR1 básica. Los resultados obtenidos en este estudio nos han llevado a ensayar si el cultivo esterilizado de *F. oxysporum* Fo47 confiere protección a plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) contra el patógeno *P. capsici*. En el presente trabajo se discute la participación de mecanismos de resistencia inducida en la protección conferida a las plantas de pimiento por el cultivo de Fo47 y se analiza en las raíces la expresión génica de tres genes relacionados con la defensa de pimiento, *CASC1* (una sesquiterpeno ciclasa implicada en la síntesis de fitoalexinas), *CAPO1* (una peroxidasa) y *CABPR1* (una proteína PR).

2. Objetivos

Los principales objetivos del presente trabajo fueron:

- Determinar la capacidad del cultivo esterilizado de Fo47 para inducir cambios en la actividad peroxidasa en plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y analizar la abundancia de lignina y la producción de compuestos fenólicos solubles totales relacionados con el mecanismo de defensa vegetal.
- Determinar la capacidad del cultivo esterilizado de Fo47 para conferir resistencia contra *P. capsici* a plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.).
- Analizar en las raíces en pimiento la expresión de tres genes relacionados con la defensa, *CASC1*, *CAPO1* y *CABPR1*.

3. Material y métodos

3.1. Material vegetal

3.1.1. Judía

Se han empleado plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Helda. Para la obtención de las mismas, se adquirieron semillas de este cultivar en un establecimiento comercial, se sembraron en perlita y se regaron con solución nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950). Transcurridos 7 días en una cámara de cultivo a 25°C y un fotoperíodo de 16 horas, se transplantaron a una mezcla de tierra y perlita (3:1, v/v), previamente esterilizada en el autoclave, y se regaron con agua.

3.1.2. Pimiento

Se han empleado plántulas de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* ecotipo Padrón. Para la obtención de las mismas, se sembraron semillas de este ecotipo procedentes del laboratorio de Fisiología vegetal de la Universidad de A Coruña. Las semillas fueron previamente desinfectadas con lejía al 1% en vermiculita y se regaron con solución nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950). Transcurridos 14 días en una cámara de cultivo a 25°C y un fotoperíodo de 16

horas, se transplantaron a una mezcla de tierra y perlita (3:1, v/v), previamente esterilizada en el autoclave, y se regaron con agua.

3.2. Material fúngico

3.2.1. Fo47

El aislado *Fusarium oxysporum* Fo47 fue proporcionado por C. Alabouvette y C. Steinberg (UMR INRA, Dijon, Francia). El aislado se mantuvo por cultivo en medio PDA (patata dextrosa agar) a 25°C.

3.2.2. *Phytophthora capsici*

El aislado de *Phytophthora capsici* (Pc450) fue proporcionado por F. Panabieres (UMR INRA, Sophia-Antipolis, Francia). El aislado se mantuvo por cultivo en medio V8 agar a 25°C.

3.2.2.1. Obtención de inóculo de *Phytophthora capsici*

3.2.2.1.1. Judía

El inóculo se obtuvo a partir de cultivos en medio PDA (patata dextrosa agar) incubados a 25°C durante 7 días. Se utilizaron discos del cultivo de 12 mm de diámetro.

3.2.2.1.2. Pimiento

El inóculo se obtuvo a partir de cultivos en medio sólido V8 agar incubados a 25°C durante 7 días. El cultivo en V8 agar se usó como inóculo inicial de un medio con KNO₃ a 25°C en agitación (150 rpm) durante 4 días. Transcurridos 4 días el medio se expuso a 4 °C durante 45 minutos y a temperatura ambiente otros 45 minutos para la obtención de zoosporas; posteriormente se filtró a través de una gasa y se ajustó la concentración del inóculo a 10³ zoosporas/ml.

3.3. Método de tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47

Las plantas de judía se utilizaron para el tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47 3 días después del trasplante. Las plantas de pimiento se utilizaron para el tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47 11 días después del trasplante.

Para obtener el agente inductor, se sembraron en medio PDB (caldo de patata y dextrosa) fragmentos de un cultivo en PDA de 7 días. El medio PDB sembrado se incubó a 25°C en agitación (150 rpm) durante 7 días. Dicho cultivo se esterilizó en el autoclave, y se centrifugó a 4.770 x g durante 20 minutos. El precipitado se resuspendió en 300 ml de agua destilada y se homogenizó con una batidora durante 5 minutos.

En cada experimento se estableció un grupo como tratamiento control y otro grupo como tratamiento con Fo47. Las hojas de las plantas control fueron pulverizadas con 10 ml (judía) y 20 ml (pimiento) de H₂O destilada. Las hojas de las plantas pertenecientes al tratamiento con Fo47 se pulverizaron con 10 ml (judía) o 20 ml (pimiento) de la preparación de Fo47.

3.4. Inoculación con *Phytophthora capsici*

3.4.1. Inoculación de las hojas de judía

Después del tratamiento con Fo47 o H₂O destilada las plantas se incubaron durante 24 horas en una cámara de cultivo a 25°C y con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Posteriormente las plantas se inocularon depositando 2 discos del cultivo de Pc450 en cada hoja. Tras la inoculación las plantas se colocaron en una cámara húmeda a 25°C y con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. 72 horas después de la inoculación se midió el diámetro de cada lesión con un calibre digital. Se realizaron 2 experimentos independientes con 5 plantas por tratamiento y experimento.

3.4.2. Inoculación de las raíces de pimiento

Después del tratamiento con Fo47 o H₂O destilada las plantas fueron incubadas durante 24 horas en una cámara de cultivo a 25°C y con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Posteriormente las raíces de las plantas fueron inoculadas con 5 ml de la suspensión de zoosporas (10³ zoosporas/ml) de *P. capsici* a nivel del hipocótilo. Previamente a la inoculación, las plantas de ambos tratamientos fueron encharcadas con agua. Para medir la gravedad de los síntomas se empleó una escala que va desde 0 (sin síntomas) a 7 (muerte); los síntomas se midieron 1, 2, 3, 4 y 5 días tras la inoculación. Se realizaron 3 experimentos independientes con 10 plantas por tratamiento y experimento.

Se calculó el valor de AUDPC (Área bajo la curva de progreso de la enfermedad), según la fórmula siguiente (Fig. 9) (Campbell & Madden, 1990):

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

Figura 9. Fórmula para el cálculo de AUDPC en la que y_i = índice de severidad en la observación i , t_i = días tras la inoculación en el momento de la observación i y n = nº de observaciones.

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

3.5. Determinación de la actividad peroxidasa en judía

3.5.1. Toma de muestras y extracción de proteínas

Se realizaron tres experimentos independientes en los que se emplearon grupos de 6 plantas de judía por experimento y tratamiento. Después del tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47 o H₂O destilada, las plantas se incubaron durante 24 horas en una cámara de cultivo a 25°C y con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Tras las 24 horas se recogieron

muestras de 3 plantas para el tratamiento control y para el tratamiento con Fo47. Las plantas restantes de cada tratamiento se inocularon colocando 2 discos del cultivo de Pc450 en cada hoja. Tras la inoculación se colocaron en una cámara húmeda a 25°C y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, y se recogieron nuevas muestras 24 horas tras la inoculación. Se anotó el peso fresco de todas las muestras y éstas se almacenaron en congelador (-30°C) hasta su análisis.

Para extraer las muestras, éstas se homogeneizaron en un mortero con tampón Tris HCl 50 mM + KCl 1 M pH 7,5 + PVPP (polivinilpolipirrolidona). El PVPP se añadió aparte en una proporción de 50 miligramos por gramo de peso fresco, y a cada muestra se le añadió un volumen diferente de tampón en función del peso fresco de la misma. El extracto se filtró a través de una gasa y se centrifugó a 12.857 x g durante 20 minutos a 4°C. Las muestras de desalaron haciendo pasar 2,5 ml del sobrenadante resultante a través de columnas PD-10 (GE-Healthcare) previamente equilibradas con 25 ml de tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5 (Fig. 9). Posteriormente se recogieron las muestras desaladas y fueron congeladas a -80°C.

3.5.2. Medida de la actividad peroxidasa

El método consistió en mezclar 890 µl de tampón Tris HCl mM pH 7,5 (previamente incubado en un baño a 25°C), 10 µl de 4-metoxi-1-naftol 100 mM, 50 µl de H₂O₂ 10 mM y 50 µL de muestra y medir el incremento de absorbancia a 593 nm durante un minuto. Para el cálculo de la actividad peroxidasa se utilizó $\epsilon_{593} = 21 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, y se expresó en unidades internacionales (U) por mg de proteína (Díaz *et al.*, 2005).

3.6. Determinación de fenoles solubles totales en judía

3.6.1. Toma de muestras y extracción de fenoles

La toma de muestras es idéntica en proteínas y fenoles. Se tomaron varias plantas de cada tratamiento hasta tener aproximadamente 3-4 gramos. Cada muestra se homogenizó en mortero con 10 ml de metanol al 80%. Se recogió el homogenizado en un tubo con tapa y se incubó a 70°C durante 15 minutos. A continuación se enfrió el tubo y se centrifugó a 1.500 x g durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante en un tubo graduado. El precipitado se resuspendió en otros 10 ml de metanol al 80% y se centrifugó nuevamente a 1.500 x g durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se añadió al sobrenadante anterior, enrasándose el conjunto a 20 ml con metanol al 80%. El precipitado se conservó en metanol puro a temperatura ambiente hasta su uso para extraer paredes y medir lignina.

3.6.2. Medida de fenoles totales

La medida del contenido en compuestos fenólicos solubles totales se llevó a cabo según el método de Singleton & Rossi (1965). El método consistió en mezclar 50 µl de muestra, 750 µl de H₂O destilada y 50 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu. Tras una incubación de 3 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 150 µl de Na₂CO₃ al 20%. Tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 760 nm.

Para calcular la cantidad de fenoles presentes en las muestras se preparó previamente una recta de calibrado utilizando cuatro soluciones de ácido gálico (un ácido fenólico) en metanol al 80% con diferentes concentraciones (0,01, 0,02, 0,05 y 0,1 mg de ácido gálico/ml).

3.7. Determinación de lignina en judía

3.7.1. Extracción de paredes

Para llevar a cabo la extracción de paredes se partió del precipitado obtenido tras la extracción de fenoles. Las paredes celulares se extrajeron mediante una modificación de la técnica de Lorences & Zarra (1986) y Díaz & Merino (1998). Se eliminó el metanol del precipitado por centrifugación y posteriormente se homogeneizó en 10 ml de H₂O destilada. El homogeneizado se transfirió al tubo previamente pesado y se centrifugó a 1.500 x g durante 15 minutos. A continuación se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 6 ml de H₂O destilada; la suspensión se mantuvo una hora en agitación. Se repitió el proceso anterior tres veces (sin agitación), resuspendiendo el último precipitado en 6 ml de una solución de tampón fosfato 0,5 M pH 7,0, etanol al 5% y proteasa al 0,02% (Pronase E, Sigma Chemicals) preincubada durante dos horas a 37 °C. La suspensión final se incubó durante 18 horas a 37°C, y se centrifugó a 1500 x g durante 10 minutos. Posteriormente se realizaron tres pasos sucesivos de resuspensión con H₂O destilada y centrifugación, seguidos de otros tres lavados con etanol al 95% y dos lavados con etanol absoluto. El precipitado final se dejó secar en estufa a 37°C y, una vez seco, se pesaron las paredes extraídas.

3.7.2. Medida de la abundancia de ligninas

La medida de la abundancia de ligninas se llevó a cabo según el método de Johnson *et al.* (1961) modificado según Fry (1988) y Hatfield *et al.* (1999). Se mezclaron 5 mg de paredes celulares con 1 ml de una mezcla de bromuro acetilo y ácido acético (1:3, v/v) en un tubo cerrado, incubándolos después a 50°C durante 2 horas (con agitaciones puntuales) para posteriormente enfriarlos en hielo durante 5 minutos. A la muestra anterior se le añadió una mezcla de 0,9 ml de NaOH 2N y 5 ml de ácido acético glacial. Posteriormente se añadieron 0,1 ml de cloruro de hidroxilamonio 7,5 M, se filtró la mezcla resultante con lana de vidrio y se enrasó con ácido acético a 10 ml. Finalmente se midió la absorbancia a 280 nm. La cantidad de lignina se calcula teniendo en cuenta que una absorbancia de 0,24 se corresponde con una concentración de 10 µg de lignina/ml (Fry, 1988).

3.8. Estudio de la expresión génica en pimiento

3.8.1. Obtención de muestras

Las plantas de pimiento se indujeron e inocularon tal y como se describe en los apartados 3.3 y 3.4.2. En cada experimento se establecieron dos grupos como tratamiento control y dos grupos como tratamiento con Fo47; uno de los grupos de cada tratamiento fue inoculado con 5 ml de H₂O destilada y otro con 5 ml de la suspensión de zoosporas. Se realizaron 3 experimentos independientes con 5 plantas por tratamiento y experimento. 48 horas después de la inducción y 24 horas después de la inoculación las raíces de cada tratamiento se lavaron y pesaron conjuntamente y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

3.8.2. Extracción de RNA

Las muestras se trituraron en mortero con nitrógeno líquido. Por cada muestra se tomaron 50 mg del triturado en tubos eppendorf y se llevó a cabo la extracción de RNA siguiendo el protocolo del Kit de BioRad “Aurum™ Total RNA Mini Kit”.

3.8.3. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo de “iScript cDNA Synthesis Kit” de Bio-Rad, utilizando el RNA extraído anteriormente como molde para su retrotranscripción.

3.8.4. Medida de expresión génica por qPCR (o PCR cuantitativa)

Las muestras de cDNA obtenidas se enviaron al SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de A Coruña y se analizaron con el “iCycler iQ System” de Bio-Rad según Silvar *et al.* (2008). Para la amplificación se utilizaron cebadores específicos para los genes *CABPR1*, *CASC1* y *CAPO1* (Tabla 3). La mezcla de reacción (50 µl) contiene 1 X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0.3 µM de cada cebador y 2.5 µl de cDNA. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de amplificación (20 segundos a 95°C, 25 segundos a 58°C y 50 segundos a 72°C) y finalmente una elongación de 5 minutos a 72°C.

Los resultados obtenidos se analizaron con el software Optical System Software 3.0 (Bio-Rad). Como control endógeno se empleó el gen de la actina (*CaAct*), que se expresa constitutivamente. Se comprobaron las eficiencias de amplificación y los datos de Ct obtenidos se trataron según el método de Pfaffl (2001) para obtener la expresión relativa de cada uno de los genes estudiados.

Tabla 3. Cebadores empleados en la PCR a tiempo real para la cuantificación de los niveles de RNA de los tres genes estudiados.

Gen	Nº acceso	Fuente	Nombre	Cebador Secuencia (5´-3´)	Amplión (pb)
<i>CaAct</i>	AY572427	Silvar <i>et al.</i> , 2008	CaACTFW CaACTRV	ATCCCTCCACCTTCTCACTCTC GCCTTAACCATTCTGTTCATTATC	128
<i>CABPR1</i>	AF053343	Gayoso <i>et al.</i> , 2007	CaBPR1FW CaBPR1RV	GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT CAAGCAATTATTTAAACGATCCA	301
<i>CASC1</i>	AF061285	Silvar <i>et al.</i> , 2008	CASC1FW CASC1RV	GCCTCCTGCTTCTGAATACC TTAATATCCTTCCATCCCGACTC	312
<i>CAPO1</i>	AF442386	García <i>et al.</i> , 2015	CAPXFW CAPXRV	ACACTGGAAGCGTGAACAAT CAGCTTGCCTAACATGAAC	333

3.9. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando STATGRAPHICS 5.1 para Windows. Los datos de diámetro de la lesión en las plantas de judía fueron analizados con la prueba t-

Student. En el bioensayo con *P. capsici* los datos de AUPDC en las plantas de pimiento fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis. Los datos de actividad peroxidasa, compuestos fenólicos solubles totales y abundancia de lignina fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis, al igual que la expresión de *CABPR1*, *CASC1* y *CAPO1*.

4. Resultados

4.1. Protección conferida por el tratamiento con Fo47 frente a *Phytophthora capsici*

4.1.1. *Phaseolus vulgaris*

Hemos medido el diámetro de la lesión 72 horas después de la inoculación con *P. capsici*. En algunos casos el diámetro de la lesión de los dos discos del micelio de *P. capsici* en las hojas tratadas con H₂O destilada se solapaba, mientras que en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 la severidad era menor (Figura 10). Comparando las medias de diámetro de la lesión por planta del tratamiento control y tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos (t-Student, $p= 0,003$) (Figura 11). Previamente en nuestro laboratorio habíamos observado diferencias estadísticamente significativas de área enferma, severidad de la enfermedad y AUDPC entre ambos tratamientos. La reducción del valor de AUDPC y severidad de la enfermedad en las plantas inducidas con Fo47 junto con la reducción del área de infección y el diámetro de la lesión demostraron que Fo47 fue eficaz en el control de *P. capsici* en judía.

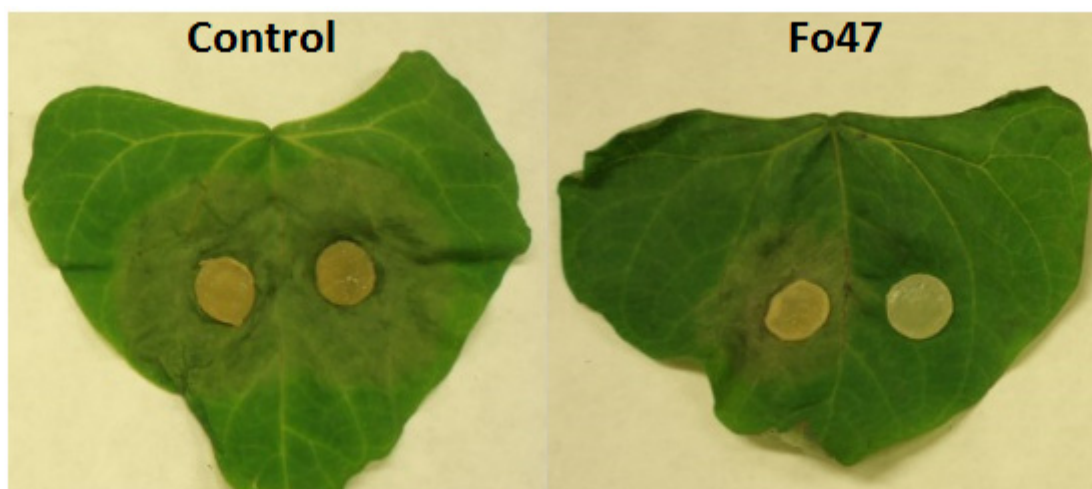


Figura 10. Hojas de judía 72 horas después de la inoculación con *P. capsici* previamente tratadas con el cultivo esterilizado Fo47 (derecha) o H₂O destilada (izquierda).

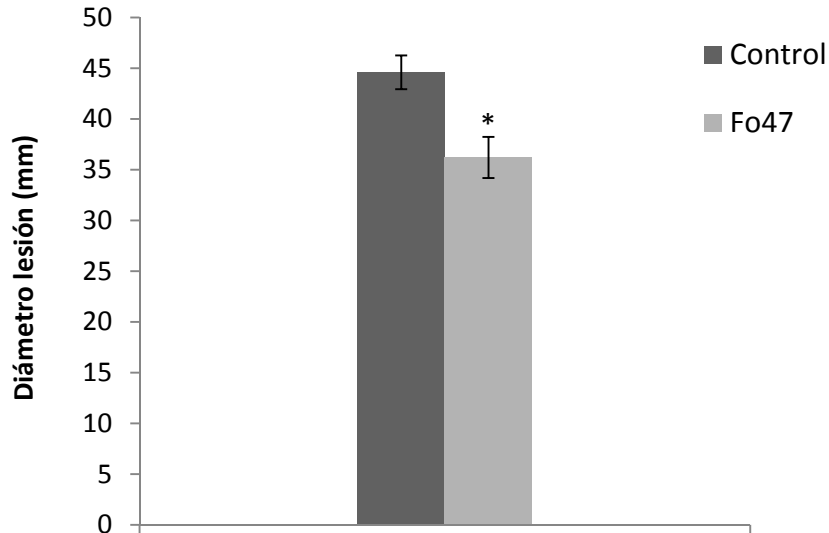


Figura 11. Diámetro de la lesión (mm) para cada tratamiento 72 horas tras la inoculación de las hojas de judía con *P. capsici*. Los datos son medias \pm error estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la prueba t-Student.

4.1.2. *Capsicum annuum*

La marchitez foliar y la podredumbre del hipocótilo se redujo en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47, especialmente 72 horas después de la inoculación con *P. capsici* (Figura 12). Como se esperaba, el cultivo esterilizado de Fo47 no cambió el desarrollo normal de las plantas, ya que las plantas inducidas no diferían en tamaño de las plantas control. Se analizó la AUDPC y se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento control y el tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47 (Kruskal-Wallis, $p = 0,0004$) (Figura 13). La reducción del valor de AUDPC en las plantas tratadas con el cultivo esterilizado de Fo47 indica que dicho tratamiento fue eficaz en el control de *P. capsici* en pimiento.

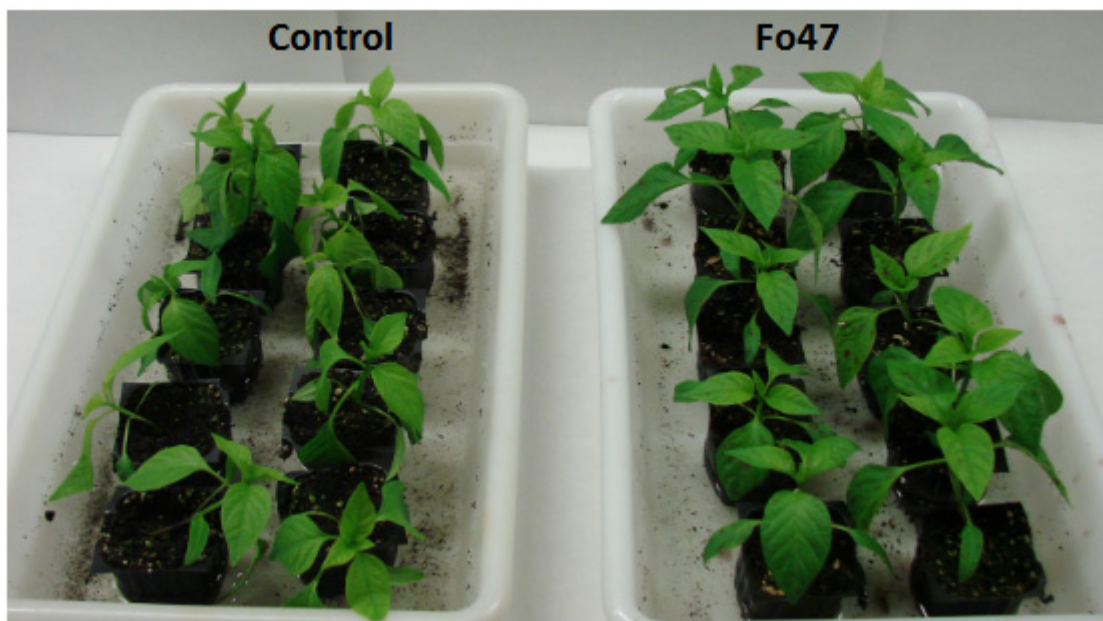


Figura 12. Plantas de pimiento 72 horas después de la inoculación con *P. capsici* previamente tratadas con el cultivo esterilizado de Fo47 (derecha) o H₂O destilada (izquierda).

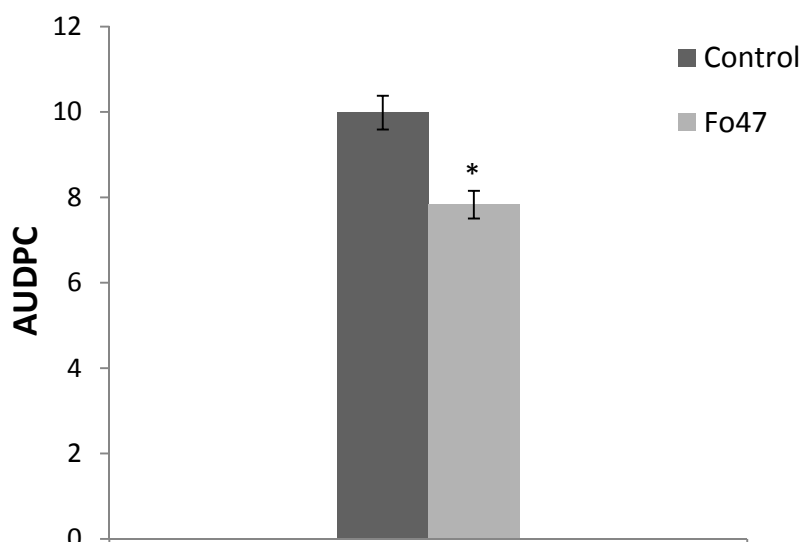


Figura 13. AUDPC para cada tratamiento en un periodo de 5 días tras la inoculación de las plantas de pimiento con *P. capsici*. Los datos son medias \pm error estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la prueba de Kruskal-Wallis.

4.2. Efecto del tratamiento de Fo47 en la actividad peroxidasa de judía

Se analizó la actividad peroxidasa en el momento de la inoculación y 24 horas después. El análisis de la actividad peroxidasa 24 horas después de la inoculación de las plantas de judía con *P. capsici* muestra diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos (Kruskal-Wallis, $p = 0,0495$) (Figura 14). Las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 también presentan una mayor actividad peroxidasa antes de la inoculación con el patógeno en comparación con las plantas control, pero la diferencia no es significativa.

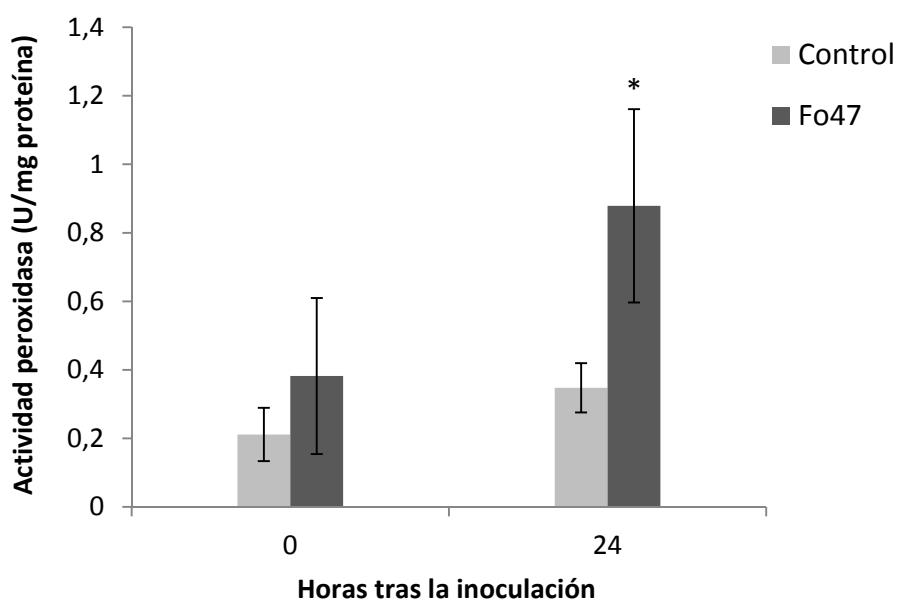


Figura 14. Actividad peroxidasa 0 y 24 horas tras la inoculación con *P. capsici*. Los datos son medias \pm error estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$) en la prueba Kruskal-Wallis.

4.3. Efecto del tratamiento de Fo47 en el contenido en compuestos fenólicos solubles totales de judía

Se comparó el contenido en compuestos fenólicos solubles totales de ambos tratamientos tanto a 0 horas como a 24 horas tras la inoculación con *P. capsici*; el análisis estadístico muestra diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento control y el tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47 24 horas después de la inoculación (Kruskal-Wallis, $p = 0,0495$) (Figura 15). El contenido en compuestos fenólicos se redujo en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 tanto a 0 horas como a 24 horas tras la inoculación, pero a 0 horas la diferencia no es significativa.

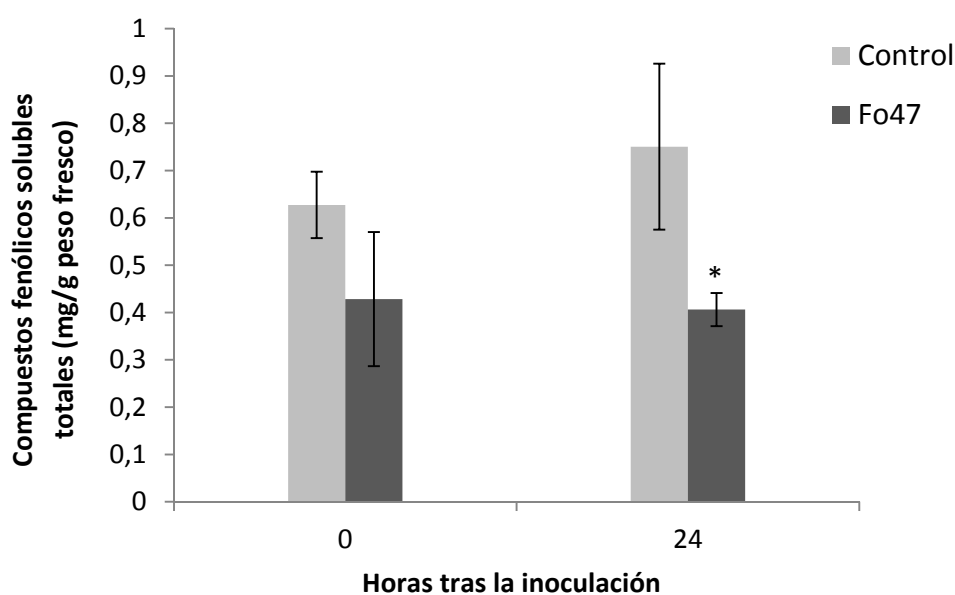


Figura 15. Contenido en compuestos fenólicos solubles totales 0 y 24 horas tras la inoculación con *P. capsici*. Los datos son medias \pm error estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$) en la prueba Kruskal-Wallis.

4.4. Efecto del tratamiento de Fo47 en la abundancia de ligninas de judía

No se observaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p = 0,127$) en el contenido de lignina entre el tratamiento control y el tratamiento con el cultivo esterilizado de Fo47 ni antes de la inoculación con el patógeno ni, 24 horas tras la inoculación (Figura 16).

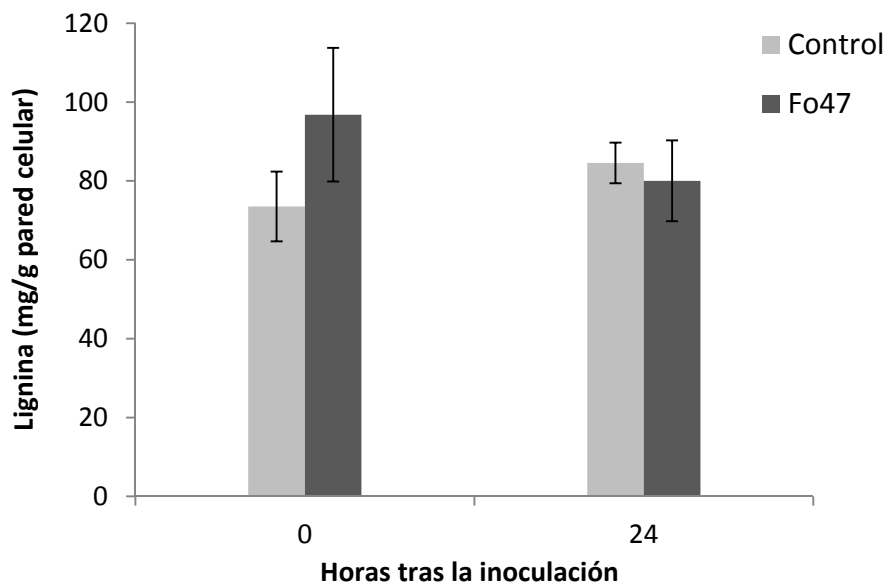


Figura 16. Contenido en lignina para cada tratamiento 0 y 24 horas tras la inoculación con *P. capsici*. Los datos son medias \pm error estándar.

4.5. Expresión génica de *CABPR1*, *CASC1* y *CAPO1* en pimiento

Se analizó la expresión génica de *CASC1*, *CABPR1* y *CAPO1* en las raíces de pimiento. El nivel de expresión de *CABPR1* y *CASC1* fue ligeramente mayor en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 no inoculadas en comparación con las plantas control, pero las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, el nivel de expresión de *CAPO1* disminuyó significativamente en las plantas inducidas (Kruskal Wallis, $p = 0,0495$) (Figura 17).

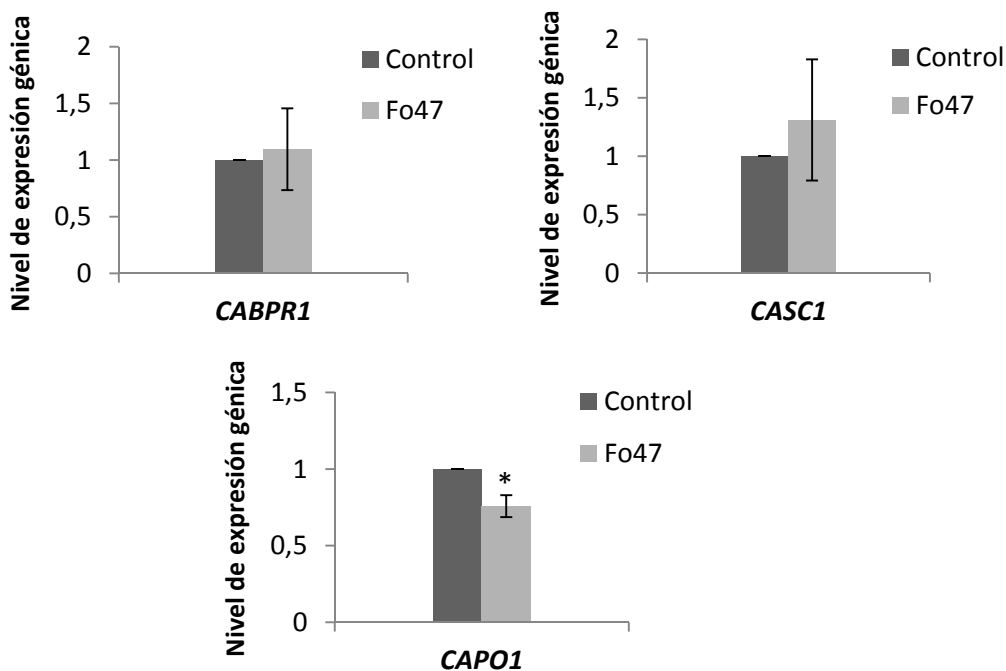


Figura 17. Expresión génica de tres genes relacionados con la defensa (*CABPR1*, *CASC1* y *CAPO1*) en pimiento 48 horas tras la inducción con el cultivo esterilizado de Fo47. Los datos son medias \pm error estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$) en la prueba Kruskal-Wallis.

Los tres genes mostraron un nivel mayor de expresión en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 e inoculadas con *P. capsici* en comparación con las plantas no inducidas e inoculadas con el patógeno, siendo las diferencias significativas en el caso de *CASC1* (Kruskal-Wallis, $p= 0,0495$) (Figura 18).

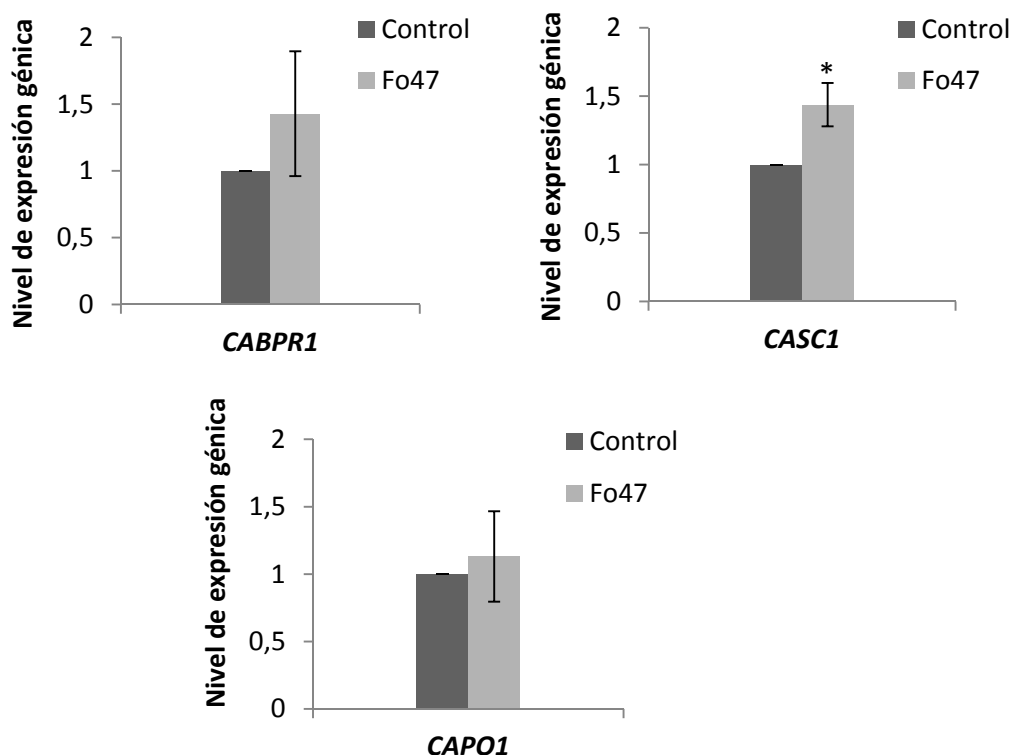


Figura 18. Expresión génica de tres genes relacionados con la defensa (*CABPR1*, *CASC1* y *CAPO1*) en pimiento 24 horas tras la inoculación con *P. capsici*. Los datos son medias \pm error estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$) en la prueba Kruskal-Wallis.

5. Discusión

Hoy en día un programa de control integrado de enfermedades implica la combinación de pesticidas, agentes de biocontrol y fitofortificantes. La explotación con fines comerciales de ciertos organismos de control biológico ha adquirido gran importancia; en los próximos años se espera un considerable crecimiento del mercado de biopesticidas (Nollet & Rathore, 2015).

Debido a sus notables propiedades biológicas, *Fusarium oxysporum* Fo47 ofrece muy buenas perspectivas para la gestión integrada de enfermedades radiculares en los cultivos de invernadero (Benhamou *et al.*, 2002).

Existen estudios en los que se ha comprobado la eficacia de Fo47 frente a diferentes patógenos. Veloso & Díaz (2012) comprobaron que la aplicación del hongo vivo reduce los síntomas de las enfermedades provocadas por *Verticillium dahliae* y *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento; sin embargo, Fo47 no indujo resistencia contra *Botrytis cinerea*. Además del empleo del hongo vivo, diferentes extractos de *Fusarium* han sido ensayados con éxito frente a varias enfermedades vegetales. Veloso & Díaz (2013) demostraron que una fracción

de un extracto crudo obtenido a partir de una cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) induce resistencia en plantas de pimiento contra *Botrytis cinerea*, pero no contra *Verticillium dahliae*. Sin embargo, Díaz *et al.* (2005) observaron que esta misma cepa protege a las plantas de pimiento contra ambos patógenos. La fracción insoluble del extracto crudo de FOL contiene elicitores que protegen a las plantas de pimiento contra *B. cinerea* a través de la activación de genes de defensa, y esta respuesta difiere de la observada para el hongo vivo, que protege contra una gama más amplia de agentes patógenos y activa un patrón diferente de genes de defensa. La variedad de respuestas provocadas por las diferentes preparaciones crudas sugiere la existencia de varios elicitores presentes en el micelio de *Fusarium*; cada uno de ellos desencadena una respuesta diferente en la planta (Velo & Díaz, 2013). El uso de un extracto de cultivo esterilizado puede hacer más cómoda su aplicación, manteniendo parte de las propiedades inductoras de resistencia del hongo vivo. Metabolitos secundarios tales como el ácido fusárico, Nep1 y tomatinasa son posibles candidatos a PAMPs (o MAMPs) producidos por cepas de *F. oxysporum* que inducen respuestas de defensa vegetales a bajas concentraciones (Ito *et al.*, 2004; Bae *et al.*, 2006; Bouizgarne *et al.*, 2006). Nep1 (necrosis- and ethylene-inducing peptide) es uno de los elicitores más conocidos de *F. oxysporum* y está implicado en la inducción de muerte celular en tabaco (Jennings *et al.*, 2001). No se sabe si estos metabolitos secundarios son específicos para las cepas patógenas o no patógenas, por lo que no se conoce su implicación en el *priming* de la ISR (Vos *et al.*, 2014).

En el presente estudio se observó la protección conferida por un cultivo esterilizado de Fo47 a plantas de pimiento frente a *P. capsici*; esta misma respuesta ha sido observada en estudios realizados previamente en judía (Lois, 2014). Velo & Díaz (2012) indujeron las raíces de pimiento con un extracto de Fo47 e inocularon por un lado las hojas con discos del micelio de *P. capsici* y por otro lado las raíces con un volumen determinado de la suspensión de zoosporas del oomiceto. Fo47 protegió las plantas de pimiento cuando las raíces fueron inoculadas con *P. capsici*; sin embargo, cuando se inoculó el patógeno en las hojas Fo47 sólo protegió a las plantas 48 horas después de la inoculación, pero no a las 72 horas. En nuestro estudio, por el contrario, las hojas de pimiento fueron inducidas con un cultivo esterilizado de Fo47 y la inoculación con *P. capsici* se realizó en las raíces; los resultados que obtuvimos muestran que Fo47 protegió las plantas de pimiento. Castro (2014) obtuvo la misma respuesta cuando indujo las hojas de pimiento con un extracto crudo de Fo47 y posteriormente inoculó las hojas con *B. cinerea*. El trabajo previamente realizado en plantas de judía con el mismo agente inductor mostraba una reducción de la enfermedad; el cultivo esterilizado de Fo47 se había aplicado en las hojas y la inoculación se realizó depositando discos del micelio de *P. capsici* en las hojas (Lois, 2014).

La gran variedad de resultados obtenidos en diferentes estudios probablemente está influenciada por el tipo de especie vegetal, el patógeno empleado y el tipo de agente inductor; los diferentes métodos de inducción e inoculación en distintas zonas de la planta pueden explicar la variación (protección o no) en los resultados obtenidos en los múltiples estudios realizados, además del empleo de un agente inductor vivo o previamente esterilizado.

La respuesta de inducción de resistencia a *P. capsici* en plantas de judía con un cultivo esterilizado de Fo47 mostró una mayor actividad β -1,3-glucanasa 24 horas después de la inoculación con el patógeno (Lois, 2014); este aumento en la actividad β -1,3-glucanasa nos ha

llevado a analizar la actividad peroxidasa, el contenido en compuestos fenólicos solubles totales y la abundancia de lignina en las plantas de judía, que, al igual que las β -1,3-glucanasas, forman parte de las defensas inducidas.

Las peroxidasas, fenoles y PAL están directa o indirectamente implicados en el desarrollo de la HR, la biosíntesis de material de refuerzo de la pared celular (lignina, suberina), compuestos antimicrobianos y moléculas de señalización (SA y JA) (Kolattukudy *et al.*, 1992; Creelman & Mullet, 1997; Daayf *et al.*, 1997; Hammerschmidt, 1999). Es sabido que la actividad PAL y la producción de fitoalexinas son inducidas por elicitores del micelio de *F. oxysporum* (Buiatti *et al.*, 1985). Naveen *et al.* (2013) vieron que la pulverización de plantas de pimiento con glicoesfingolípidos aislados y purificados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* induce la acumulación de H₂O₂, PAL, peroxidasa y fenoles, y una disminución de la incidencia de la enfermedad; este aumento de la actividad peroxidasa se correlacionó con la acumulación de lignina. Biles & Martyn (1993) y Martyn *et al.* (1996) vieron una correlación entre la inducción de resistencia por *F. oxysporum* f.sp. *niveum* en sandía y el incremento de la actividad peroxidasa. En el estudio de Díaz *et al.* (2005) las peroxidasas no fueron inducidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, pero los niveles de compuestos fenólicos unidos a la pared celular fueron mayores en las plantas tratadas con esta cepa, especialmente en tallos; esto puede estar relacionado con un aumento de las barreras físicas frente a la infección, como ocurre con la respuesta a elicitores en perejil (Conrath *et al.*, 2001) y *Arabidopsis* (Tan *et al.*, 2004).

En el ensayo de inducción de resistencia a *P. capsici* en judía con un cultivo esterilizado de Fo47 se pudo ver que únicamente las plantas tratadas con Fo47 e inoculadas con *P. capsici* mostraron una subida considerable en la actividad peroxidasa, de forma que consiguieron una mayor protección contra el patógeno que las plantas control. En el trabajo de Castro (2014) se observó una mayor actividad β -1,3-glucanasa en las plantas de pimiento inducidas con el extracto crudo de Fo47 después de la inoculación con *B. cinerea* que coincide con la observada en las plantas de judía inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 e inoculadas con *P. capsici* (Lois, 2014). Vimos que el aumento de la actividad peroxidasa en judía también era similar al observado por Castro (2014) en pimiento. A pesar de utilizar dos patógenos con diferentes estrategias de infección como son *P. capsici* (hemibiotrofo) y *B. cinerea* (necrotrofo) y dos especies vegetales distintas, el grado de protección conferida y el nivel de actividad enzimática relacionada con la defensa es muy parecido en ambas interacciones planta-patógeno.

Díaz *et al.* (2005) observaron que la actividad peroxidasa era similar en las plantas inducidas con FOL vivo y las plantas control tras la inoculación con el patógeno pero el contenido de compuestos fenólicos de la pared celular en el tallo se duplicaba en las plantas inducidas; en nuestro estudio el contenido en compuestos fenólicos disminuyó significativamente después de la inoculación con *P. capsici*, pero no hubo diferencias significativas en el contenido de lignina. He *et al.* (2002) vieron que una cepa no patógena de *F. oxysporum* no inducía una mayor actividad peroxidasa y lignina en *Asparagus officinalis* antes de la inoculación con el patógeno, pero sí después de la inoculación con *F. oxysporum* f.sp. *asparagi*. Los diferentes resultados pueden deberse al hecho de que la resistencia inducida sea más fuerte de manera local, es decir, en aquella zona tratada con el elicitador. Aunque la protección es más intensa en aquellos tejidos tratados con el elicitador, cuando las plantas están expuestas al ataque de

patógenos necrotizantes se acumulan cantidades importantes de determinadas enzimas tanto en el lugar de la infección como en los tejidos distantes. La presencia de estas enzimas en las plantas infectadas se ha relacionado con el desarrollo de la lesión y la limitación de la propagación de la enfermedad (Xue *et al.*, 1998).

Una posible explicación a nuestros resultados es que el tiempo transcurrido tras la inoculación con *P. capsici* en las plantas de judía inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 (24 horas) es suficiente para que aumente la actividad peroxidasa, pero todavía estaría en proceso la formación de compuestos fenólicos y lignina que refuercen la pared celular de las plantas de judía para defenderse del ataque del patógeno; de este modo, sería interesante medir la actividad de estas enzimas a un tiempo mayor de 24 horas después de la inoculación.

Otra posible explicación reside en el estatus redox en la planta. La respuesta clásica de las células animales y vegetales ante el ataque de patógenos consiste en un estallido oxidativo y una producción repentina de especies activas de oxígeno que aparecen brevemente y/o horas después de ciertos estreses (Kawano, 2003; Mika *et al.*, 2004; Torres & Dangl, 2005; Sumimoto, 2008). El estrés oxidativo es esencial para el establecimiento de una respuesta de resistencia efectiva mediante la activación de elementos aguas abajo que sobre regulan la producción de proteínas antimicrobianas y compuestos fenólicos (Levine *et al.*, 1994), causando peroxidación lipídica y cambios en la permeabilidad de las membranas (Qiu & Liang, 1995; Rawlyer *et al.*, 2002). El estallido oxidativo es promovido por diversos elicitores, entre ellos las elicinas (Virad *et al.*, 1994), péptidos fúngicos purificados (Vera-Estrella *et al.*, 1992) y otras moléculas procedentes de extractos de patógenos (Schwacke & Hager, 1992). La producción de ROS, entre ellas H_2O_2 , se puede observar después de la aplicación de elicitores fúngicos (Paré *et al.*, 2005). Los fenoles también reflejan el estatus redox en la planta (un mayor contenido en compuestos fenólicos implica un mayor poder reductor); el hecho de que el contenido en compuestos fenólicos descienda con la aplicación del cultivo esterilizado de Fo47 refleja un menor poder reductor que podría estar relacionado con el grado de resistencia obtenido y con una mayor producción de ROS. De hecho, las peroxidasas tienen más funciones que la síntesis de lignina, entre ellas la producción de H_2O_2 (Almagro, 2009).

Bolwell *et al.* (2002) demostraron que las peroxidasas apoplásticas solubles se pueden unir a la membrana plasmática de *Phaseolus vulgaris* L. en presencia de ciertos estreses. Chivasa *et al.* (2005) observaron que el tratamiento de cultivos celulares de maíz con un elicitador de *Fusarium verticillioides* inducía la acumulación de H_2O_2 que, a su vez, se relacionaba con el desarrollo de un estallido oxidativo inducido por el patógeno; demostraron también que el estado de fosforilación de las peroxidasas extracelulares cambiaba rápidamente en respuesta al tratamiento con el elicitador de *Fusarium*, sugiriendo una posible señalización intercelular inducida por el patógeno y regulada por eventos de fosforilación/desfosforilación a través de la matriz extracelular.

Mika *et al.* (2010) observaron que la aplicación de raíces de maíz con extractos de *F. graminearum* y *F. culmorum* que actúan como elicitores y el tratamiento de las raíces con MeJA y SA incrementó la actividad de cuatro peroxidasas de unión a la membrana plasmática, sugiriendo una amplia función de las mismas en el estrés oxidativo; probablemente estas peroxidasas participen sustancialmente en la detoxificación de la célula y/o en la reparación de

la membrana plasmática, pudiendo desempeñar un papel importante para mantener las funciones celulares en diferentes condiciones de estrés. La mayor expresión de todas las isoenzimas de la membrana plasmática provocada por MeJA sugiere una función de estas peroxidasas en la SAR.

Dey *et al.* (2010) observaron que el tratamiento con el elicitor de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* EFOL-2 induce un influxo de calcio citosólico en una línea de tomate resistente a *Fusarium*, confirmando el requerimiento de calcio citosólico libre para la generación de ROS. La entrada de calcio conduce a cambios en el potencial de membrana en la fase inicial de la respuesta de defensa (Blume *et al.*, 2000; Kadota *et al.*, 2004), y a menudo está acompañada de la generación de ROS (Link *et al.*, 2002) mediando la HR (Levine *et al.*, 1994); sin embargo, la respuesta de resistencia observada en tomate es independiente de la muerte celular programada, y la generación transitoria de ROS dependiente de calcio es, posiblemente, parte de la maquinaria de señalización. El calcio se requiere para la activación de MAP quinasas tras el tratamiento con elicitores derivados de *Fusarium* en cultivos celulares en suspensión de tomate (Link *et al.*, 2002). El trabajo de Dey *et al.* (2010) sugiere la posibilidad del reconocimiento de factores derivados de oligosacáridos en la preparación de EFOL-2 que constituirían componentes principales de la señalización.

Las peroxidasas solubles son bien conocidas como proteínas involucradas en la SAR y en reacciones de defensa vegetal (Almagro *et al.*, 2009). El incremento de la actividad peroxidasa en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 después de la inoculación con *P. capsici* estaría relacionado con un alto nivel de ROS, principalmente H₂O₂, como consecuencia de un influxo de calcio citosólico; esto explicaría el descenso de compuestos fenólicos y que la abundancia de lignina no experimentara cambios notables, ya que, como ya hemos dicho, las peroxidasas están implicadas en otros procesos diferentes de la síntesis de lignina como refuerzo de la pared celular y que están relacionados con el aumento de ROS. Además, el descenso en compuestos fenólicos está reflejando un menor poder reductor. Es probable que el aumento de la actividad peroxidasa en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 después de la inoculación con *P. capsici* se relacione con un fenómeno de “priming” en una respuesta de tipo SAR o ISR; sería interesante medir el nivel de H₂O₂ en estas plantas, además del nivel de SA o JA que podría facilitar el encaminarnos hacia un fenómeno de SAR o de ISR.

Es sabido que Fo47 es capaz de estimular la expresión de genes de defensa desencadenando la HR, lo que conduce al aumento de la resistencia a la enfermedad (Benhamou & Garand, 2001; Choi & Hwang, 2015). En nuestro estudio se analizó el nivel de expresión de tres genes de pimiento relacionados con la defensa: *CABPR1*, *CASC1* y *CAPO1*. Hemos observado una ligera disminución del nivel de infección en las raíces de pimiento que coincide con un aumento leve del nivel de expresión génica.

CABPR1 se acumula de forma temprana cuando se trata de interacciones incompatibles, es decir, cuando se establece una relación entre un huésped resistente y un patógeno avirulento (Veloso & Díaz, 2013). Papanicolaou *et al.* (2007) demostraron que PR-1 incrementa su expresión en las raíces de banano inducidas con cepas endofíticas de *F. oxysporum* e inoculadas con el nematodo *R. similis*. Veloso & Díaz (2013) observaron la expresión de *CABPR1* en raíces tallos y

hojas de pimiento tras la inducción con el extracto crudo de FOL, pero 24 horas después de la inoculación con *B. cinerea* la expresión de este gen disminuyó. Castro (2014) observó un aumento significativo de la expresión de *CABPR1* en las plantas de pimiento inducidas con el extracto crudo de Fo47 en comparación con las plantas control. En nuestro estudio la expresión de *CABPR1* también fue mayor en las plantas inoculadas con *P. capsici* e inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 en comparación con las plantas control; sin embargo, este aumento no fue significativo. Además, el hecho de que *CABPR1* sea inducible por las hormonas SA, JA y ET (Choi & Hwang, 2015) hace difícil determinar si se trata un fenómeno de resistencia inducida de tipo SAR o ISR.

La sesquiterpeno ciclasa *CASC1* se ha relacionado con la resistencia de pimiento contra *P. capsici* (Silvar *et al.*, 2008; Silvar *et al.*, 2009). Estas enzimas forman un punto de ramificación en la ruta general de los isoprenoides implicada en la conversión del intermediario isoprenoide acíclico farnesil pirofosfato en una amplia variedad de esqueletos sesquiterpénicos cíclicos; además, comprenden las primeras etapas de la síntesis de capsidiol, que inhibe el crecimiento fúngico (Taller, 2006). Veloso & Díaz (2013) observaron un aumento de la expresión de *CASC1* en las hojas de pimiento inducidas con el extracto de FOL tras la inoculación con *B. cinerea*, mostrando un efecto de *priming*. Silvar *et al.* (2009) y Veloso & Díaz (2012) también observaron un aumento de la expresión de *CASC1* en pimiento con FOL vivo y Fo47 respectivamente después de la inoculación con el patógeno. Ambos resultados apoyan el papel de *CASC1* en la resistencia desencadenada por *Fusarium* en pimiento, probablemente participando en la síntesis de capsidiol. En nuestro estudio la expresión de *CASC1* también aumentó significativamente en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 e inoculadas con *P. capsici* en comparación con las plantas control inoculadas; esto sugiere la importancia de la presencia del patógeno para una mayor expresión de los genes relacionados con la defensa vegetal. Sería interesante medir el nivel de capsidiol en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 e inoculadas con *P. capsici*. Por otra parte, en nuestro estudio el nivel de expresión de *CAPO1* fue significativamente menor en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 en ausencia de *P. capsici* en comparación con las plantas no inducidas en ausencia del patógeno; Veloso & Díaz (2013) vieron que el extracto crudo de FOL no indujo la expresión de *CAPO1*; esto podría haber sido debido a que parte de la respuesta protectora inducida por FOL en pimiento se pierde en la fracción insoluble libre de proteína, por lo que *CAPO1* podría formar parte de dicha respuesta. Sin embargo, numerosos trabajos de inducción de resistencia muestran un aumento de la actividad peroxidasa junto con el aumento de la expresión del gen *CAPO1*. Fung *et al.* (2004) encontraron un ligero aumento en los niveles de transcripción de *CAPO1* en plantas de pimiento inducidas con salicilato de metilo y con jasmonato de metilo. Do *et al.* (2003) observaron cierta expresión de *CAPO1* en plantas de pimiento tratadas con ácido salicílico.

En resumen, los resultados de nuestro estudio en judía y pimiento muestran un fenómeno de resistencia inducida en el que podrían estar implicadas diferentes vías de señalización hormonales tales como la del etileno, ácido salicílico o jasmonatos. El conocimiento de las diferencias en los procesos que se desencadenan entre especies de microorganismos no patógenos-planta y patógenos-planta que conducen a respuestas específicas en la planta como la muerte celular inducida permitiría una mejor comprensión de los modos de acción de las cepas de control biológico (Humbert *et al.*, 2015). Es necesario destacar que las interacciones

planta-patógeno representan sistemas biológicos no estáticos y dinámicos; resulta complicado buscar un mecanismo general responsable de la resistencia inducida que explique los resultados de nuestro estudio. Sería necesario profundizar más en el estudio de los efectos sobre la fisiología de la planta y del agente inductor que hemos empleado. La respuesta obtenida puede ser el resultado de la combinación de diversos mecanismos o de la inducción de nuevas rutas de respuesta todavía sin identificar.

6. Conclusiones

Tras la realización del presente trabajo se concluyó que:

- Las plantas de judía tratadas con el cultivo esterilizado de Fo47 y posteriormente inoculadas con *Phytophthora capsici* muestran una mayor actividad peroxidasa en comparación con las plantas no tratadas con este agente de biocontrol, así como el descenso en compuestos fenólicos solubles totales y la ausencia de cambios en la abundancia de lignina.
- El cultivo esterilizado de Fo47 induce resistencia en pimiento (*Capsicum annuum* L.) contra *Phytophthora capsici*.
- El nivel de expresión de *CABPR1* en las plantas de pimiento inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 no experimenta cambios significativos ni antes ni después de la inoculación con *Phytophthora capsici*. *CASC1* aumenta significativamente en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 e inoculadas con el patógeno; *CAPO1*, sin embargo, desciende significativamente en las plantas inducidas con el cultivo esterilizado de Fo47 en ausencia del patógeno.

7. Referencias

- Abramovitch, R.B., Martin, G.B.** (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**: 356-364.
- Agrios, G.N.** (2004). Plant Pathology. Elsevier Academic Press.
- Aimé, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., Olivain, C.** (2013). The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **8**: 918-926.
- Aimé, S., Cordier, C., Alabouvette, C., Olivain, C.** (2008). Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **73**: 9-15.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., Steinberg, C.** (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *The New Phytologist*, **184**: 529-544.
- Almagro, L., Gómez Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., Pedreño, M.A.** (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 377-390.

- Bae, H., Kim, M.S., Sicher, R.C., Bae, H.J., Bailey, B.A.** (2006). Necrosis- and ethylene-inducing peptide from *Fusarium oxysporum* induces a complex cascade of transcripts associated with signal transduction and cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **141**: 1056-1067.
- Bardoel, B.W., Van der Ent, S., Pel, M.J.C., Tommassen, J., Pieterse, C.M.J., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G.** (2011). *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLOS Pathogens*, **7**: e1002206.
- Bartual, R., Marsal, J.I., Carbonell, E.A., Tello, J.C., Campos, T.** (1991). Genética de la resistencia a *Phytophthora capsici* Leon. en pimiento. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, **17**: 3-124.
- Baysal, O., Turgut, C., Mao, G.** (2005). Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. *Plant Biology*, **49**: 599-604.
- Benhamou, N., Garand, C.** (2001). Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47. *Phytopathology*, **91**: 730-740.
- Benhamou, N., Garand, C., Goulet, A.** (2002). Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 4044-4060.
- Benhamou, N., Nicole, M.** (1999). Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology and Biochemistry*, **37**: 703-719.
- Biles, C.L., Martyn, R.D.** (1989). Local and systemic resistance induced in watermelons by formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **79**: 856-860.
- Biles, C.L., Martyn, R.D.** (1993). Peroxidase, polyphenoloxidase, and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, **31**: 499-506.
- Blair, J.E., Coffey, M.D., Park, S.Y., Geiser, D.M., Kang, S.** (2008). A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*, **45**: 266-277.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., Scheel, D.** (2000). Receptor mediated increase in cytosolic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *The Plant Cell*, **12**: 1425-1440.
- Boller, T.** (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**: 189-214.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibayeva, F.** (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants; a three- component system. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1367-1376.

Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J-P., Ricci, P. (1996). Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology*, **102**: 181-192.

Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Madiona, K., Biligui, B., Monestiez, M., Pennarun, A.M., Amiar, Z., Rona, J.P., Ouhdouch, Y., El Hadrami, I., Bouteau, F. (2006). A putative role for fusaric acid in biocontrol of the parasitic angiosperm *Orobanche ramosa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**: 550-556.

Bowers, J.H., Mitchell, D.J. (1990). Effect of soil-water matric potential and periodic flooding on mortality of pepper caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, **80**: 1447-1450.

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

Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A., Pickett, J.A. (2007). Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, **173**: 603-608.

Buiatti, M., Scala, A., Bettini, P., Nascari, G., Morpurgo, R., Bogani, P., Pellegrini, G., Gimelli, F., Ventura, R. (1985) Correlations between in vivo resistance to *Fusarium* and in vitro response to fungal elicitors and toxic substances in carnation. *Theoretical and Applied Genetics*, **70**: 42-47.

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

Candole, B.L., Conner, P.J., McGregor, C., Waters, V., Ji, P. (2012). The disease reactions of heirloom bell pepper “California Wonder” to *Phytophthora capsici*. *Agricultural Sciences*, **3**: 417-424.

Castro, G.E. (2014). Inducción de resistencia en pimiento con un extracto de Fo47. Trabajo fin de máster, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña.

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

Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**: 803-814.

Chivasa, S., Simon, W.J., Yu, X-L., Yalpani, N., Slabas, A.R. (2005). Pathogen elicitor-induced changes in the maize extracellular matrix proteome. *Proteomics*, **5**: 4894-4904.

Choi, H.W., Hwang, B.K. (2015). Molecular and cellular control of cell death and defense signaling in pepper. *Planta*, **241**: 1-27.

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

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

Cornell University. Phytophthora blight (*P. capsici*)
<http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html>. Última consulta: 09/06/2015.

Creelman, R.A., Mullet, J.E. (1997). Biosynthesis and action of Jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**: 355-381.

Daayf, F., Bel-Rhliid, R., B'elanger, R.R. (1997). p-Coumaric acid methyl ester, a phytoalexin like compound from long English cucumber leaves. *Journal of Chemical Ecology*, **23**: 1517-1526.

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

De Jonge, R., Van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R.M.E.H., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H.A.J., Thomma, B.P.H.J. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science*, **329**: 953-955.

Dempsey, D.A., Klessig, D.F. (2012). SOS: too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science*, **17**: 538-545.

Dey, S., Ghose, K., Basu, D. (2010). *Fusarium* elicitor-dependent calcium influx and associated ROS generation in tomato is independent of cell death. *European Journal of Plant Pathology*, **126**: 217-228.

Díaz, J., Merino, F. (1998). Wound-induced shikimate dehydrogenase and peroxidase related to lignification in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *Plant Physiology*, **152**: 51-57.

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

Diseases of Urban Plants. Phytophthora disease (*P. capsici*)
<http://ag.arizona.edu/pubs/diseases/az1124/#phyd>. Última consulta: 09/06/2015.

Dixon, D.P., Davis, B.G., Edwards, R. (2002). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants: identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 30859-30869.

Do, H.M., Hong, J.K., Jung, H.W., Kim, S.H., Ham, J.H., Hwang, B.K. (2003). Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**: 196-205.

Dodds, P.N., Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, **11**: 539-548.

Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**: 547-552.

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

- Ebel, J., Cosio, E.G.** (1994). Elicitors of plant defense responses. *International Review of Cytology*, **148**: 1-36.
- Elmer, W.H.** (2004). Combining nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* with sodium chloride to suppress Fusarium crown rot of *Asparagus* in replanted fields. *Plant Pathology*, **53**: 751-758.
- Erwin, D.C., Ribeiro, O.K.** (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society (APS Press).
- FAOSTAT** (2015). <http://faostat3.fao.org/home/E>. Última consulta: 09/06/2015.
- Feng, B., Li, P., Wang, H., Zhang, X.** (2010). Functional analysis of pcpme6 from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbial Pathogenesis*, **49**: 23-31.
- Fravel, D.R., Olivain, C., Alabouvette, C.** (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *The New Phytologist*, **157**: 493-502.
- Fry, S.C.** (1988). The growing plant cell wall: Chemical and metabolic analysis. Longman Scientific and Technical, Essex.
- Fu, Z.Q., Dong, X.** (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, **6**: 839-863.
- Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S.H., Tada, Y., Zheng, N., Dong, X.** (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, **486**: 228-232.
- Fuchs, J.G., Moëgne-Loccoz, Y., Défago, G.** (1997). Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to fusarium wilt in tomato. *Plant Disease*, **81**: 492-496.
- Fung, R.W.M., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C., Tian, M.** (2004). MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, **166**: 711-719.
- García, T., Gutiérrez, J., Veloso, J., Gago-Fuentes, R., Díaz, J.** (2015). Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. *Journal of Plant Physiology*, **176**: 202-209.
- García-Jiménez, J., Monte, E., Trapero, A.** (2010). Los hongos y Oomicetos fitopatógenos. En: Jiménez Díaz, R.M., Seguí, E.M. eds., Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. SEF-Phytoma, pp. 23-50.
- García-Mas, J., Arús, P., Monfort, A.** (2004). Base molecular de la resistencia. En: Nuez, F., Pérez de la Vega, M., Carrillo, J.M. eds., Resistencia genética a patógenos vegetales. Universidad Politécnica de Valencia, pp. 79-136.
- Gatz, C.** (2012). From pioneers to team players: TGA transcription factors provide a molecular link between different stress pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **26**: 151-159.

- Gayoso, C., Martinez de Ilarduya, O., Pomar, F., Merino, F.** (2007). Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, **118**: 199-209.
- Gevens, A.J., Donahoo, R.S., Lamour, K.H., Hausbeck, M.K.** (2008). Characterization of *Phytophthora capsici* causing foliar and pod blight of snap bean in Michigan. *Plant Disease*, **92**: 201-209.
- Gevens, A.J., Roberts, P.D., McGovern, R.J., Kucharek, T.A.** (2011). Vegetable diseases caused by *Phytophthora capsici* in Florida. *Florida Cooperative Extension Service*, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Métraux, J.P., Zhu, T., Katagiri, F.** (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal*, **34**: 217-228.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **43**: 205-227.
- Granke, L.L., Hausbeck, M.K.** (2010). Effects of temperature, humidity, and wounding on development of *Phytophthora* rot of cucumber fruit. *Plant Disease*, **94**: 1417-1424.
- Granke, L.L., Quesada-Ocampo, L., Lamour, K., Hausbeck, M.K.** (2012). Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in The United States. *Plant Disease*, **95**: 1588-1600.
- Goellner, K., Conrath, U.** (2008). Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, **121**: 233-242.
- Gutiérrez, G.C., de la Torre-Almaraz, R.** (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, **13**: 157-162.
- Hammerschmidt, R.** (1999). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**: 77-84.
- Hahn, M.G.** (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology*, **34**: 387-412.
- Hardham, A.R.** (1992). Cell biology of pathogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**: 491-526.
- Hatfield, R.D., Grabber, J., Ralph, J., Brei, K.** (1999). Using the acetylbromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: Some cautionary notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 628-632.
- Hausbeck, M.K., Lamour, K.H.** (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease*, **88**: 1292-1303.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N.** (1995). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International.

- He, C.Y., Hsiang, T., Wolyn, D.J.** (2001). Activation of defense responses to *Fusarium* infection in *Asparagus densiflorus*. *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 473-483.
- He, C.Y., Hsiang, T., Wolyn, D.J.** (2002). Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, **51**: 225-230.
- He, C.Y., Wolyn, D.J.** (2005). Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. *Plant Pathology*, **54**: 227-232.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I.** (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, **347**: 1-32.
- Huertas-González, M.D., Ruiz-Roldán, M.C., Maceira, F.I.G., Roncero, M.I.G., Di Pietro, A.** (1999). Cloning and characterization of pl1 encoding an in planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics*, **35**: 36-40.
- Humbert, C., Aimé, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., Olivain, C.** (2015). Remodelling of actin cytoskeleton in tomato cells in response to inoculation with a biocontrol strain of *Fusarium oxysporum* in comparison to a pathogenic strain. *Plant Pathology*, DOI: 10.1111/ppa.12375.
- Hwang, B.K., Kim, C.H.** (1995). *Phytophthora* blight of bell pepper and its control in Korea. *Plant Disease*, **79**: 221-227.
- Ito, S.I., Eto, T., Tanaka, S., Yamauchi, N., Takahara, H., Ikeda, T.** (2004). Tomatine and lycotetraose, hydrolysis products of alpha-tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. *FEBS Letters*, **571**: 31-34.
- Jennings, J.C., Apel-Birkhold, P.C., Mock, N.M., Baker, C.J., Anderson, J.D., Bailey, B.A.** (2001). Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. *Plant Science*, **161**: 891-899.
- Jiménez-Díaz, R.M., Zabalgoceazcoa, I.** (2010). Infección y patogénesis en las micosis vegetales. En: Jiménez Díaz, R.M., Seguí, E.M. eds., Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. SEF-Phytoma, pp. 51-85.
- Johnson, D.B., Moore, W.E., Zank, L.C.** (1961). The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, **44**: 793-798.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature*, **444**: 323-329.
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J., Greenberg, J.T.** (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, **324**: 98-91.
- Jung, S.C., Martínez-Medina, A., López-Raez, J.A., Pozo, M.J.** (2012). Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, **38**: 651-664.
- Kadota, Y., Goh, T., Tomatsu, H., Tamauchi, R., Higashi, K., Muto, S., Kuchitsu, K.** (2004). Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells; pharmacological characterization of

molecular relationship among cytosolic Ca²⁺ transientes, anion efflux and production of reactive oxygen species. *Plant and Cell Physiology*, **45**: 160-170.

Kawano, T. (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reaction in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports*, **21**: 829-837.

Kessler, A., Baldwin, I.T. (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, **53**: 299-328.

Kim, K.D., Nemec, S., Musson, G. (1997). Control of *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper with composts and soil amendments in the greenhouse. *Applied Soil Ecology*, **5**: 169-179.

Ko, W. (1988). Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*, **26**: 57-73.

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

Kolattukudy, P.E., Mohan, R., Bajar, M.A., Serf, B.A. (1992). Plant peroxidase gene expression and function. *Biochemical Society Transactions*, **20**: 333-337.

Kombrink, E., Somssich, I.E. (1995). Defense responses of plants to pathogens. *Advances in Botanical Research*. Academic Press, **21**: 1-34.

Kousik, C.S., Donahoo, R.S., Hassell, R. (2012). Resistance in watermelon rootstocks to crown rot caused by *Phytophthora capsici*. *Crop Protection*, **39**: 18-25.

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

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

Larkin, R.P., Fravel, D.R. (1999). Mechanisms of action and dose–response relationships governing biological control of fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology*, **89**: 1152-1161.

Lee, B.K., Kim, B.S., Chang, S.W., Hwang, B.K. (2001). Aggressiveness to pumpkin cultivars of isolates of *Phytophthora capsici* from pumpkin and bell pepper. *Plant Disease*, **85**: 497-500.

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

Levine, A., Tenhaken, A., Dixon, R., Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79**: 583-593.

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

- Link, V.L., Markus, G.H., Sinha, A.K., Ehness, R., Strnad, M., Roitsch, T.** (2002). Biochemical evidence for the activation of distinct subsets of mitogen- activated protein kinases by boltage and defense-related stimuli. *Plant Physiology*, **128**: 271-281.
- Lois, M.** (2014). Ensayo de inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en judía (*Phaseolus vulgaris*) con un cultivo esterilizado de Fo47. Trabajo fin de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña.
- Lorences, E.P., Zarra, I.** (1986). Hypocotyl growth of *Pinus pinaster* seedlings. Changes in osmotic potential and cell wall composition. *Physiologia Plantarum*, **67**: 377-382.
- Lucas, J.A.** (1998). *Plant Pathology and Plant Pathogens*. 3ª ed. Blackwell Publishing.
- Luna, E., Ton, J.** (2012). The epigenetic machinery controlling transgenerational systemic acquired resistance. *Plant Signaling & Behavior*, **7**: 615-618.
- Lyon, G.** (2007). Agents that can elicit induced resistance. En: Walters, D., Newton, A., Lyon, G., eds., *Induced Resistance for Plant Disease Control: a sustainable approach to crop protection*. Blackwell Publishing, pp. 9-29.
- Martyn, R.D., Díaz, J., Kim, D-H.** (1996). *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* race 2 transformed with race 0-DNA induces resistance and peroxidase activity in watermelon similar to wild type race 0. *Phytopathology*, **86**: S45.
- Mauch-Mani, B., 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*. *The Plant Cell*, **8**: 203-212.
- Mika, A., Boenisch, M.J., Hopff, D., Lüthje, S.** (2010). Membrane-bound guaiacol peroxidases from maize (*Zea mays* L.) roots are regulated by methyl jasmonate, salicylic acid, and pathogen elicitors. *Journal of Experimental Botany*, **61**: 831-841.
- Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., Lüthje, S.** (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, **3**: 173-193.
- Montesano, M., Brader, G., Palva, E.T.** (2003). Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, **4**: 73-79.
- Naveen, J., Hariprasad, P., Nayaka, S.C., Niranjana, S.R.** (2013). Cerebroside mediated elicitation of defense response in chilli (*Capsicum annum* L.) against *Colletotrichum capsici* infection. *Journal of Plant Interactions*, **8**: 65-73.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B.F.III, Dangl, J.L.** (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, **37**: 579-609.
- Nollet, L.M., Rathore, H.S.** (2015). *Biopesticides Handbook*. CRC Press.

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

Nürnberger, T. (1999). Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**: 167-182.

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

Olivain, C., Alabouvette, C. (1999). Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytologist*, **141**: 497-510.

Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L'Haridon, F., Alabouvette, C. (2006). Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 1523-1531.

Olivain, C., Steinberg, C., Alabouvette, C. (1995). Evidence of induced resistance in tomato inoculated by nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. En: Manka, M., ed. *Environmental biotic factors in integrated plant disease control*. The Polish Phytopathological Society, pp. 427-430.

Olivain, C., Trouvelot, S., Binet, M.N., Cordier, C., Pugin, A., Alabouvette, C. (2003). Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 5453-5462.

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

Palazón, C., Palazón, I. (1989). Estudios epidemiológicos sobre la "tristeza" del pimiento en la zona del Valle Medio del Ebro. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, **15**: 233-262.

Paparu, P., Dubois, T., Coyne, D., Viljoen, A. (2007). Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa* spp.) following inoculation with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **71**: 149-157.

Paré, P.W., Farag, M.A., Krishnamachari, V., Zhang, H., Ryu, C.M., Kloepper, J.W. (2005). Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. *Photosynthesis Research*, **85**: 149-159.

Park, S., Rancour, D.M., Bednarek, S.Y. (2007). Protein domain-domain interactions and requirements for the negative regulation of *Arabidopsis* CDC48/p97 by the plant ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein, PUX1. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**: 5217-5224.

Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany*, **94**: 46-56.

- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**: e45.
- Pieterse, C.M.J., van der Does, D., Zamioudis, C., León-Reyes, A., van Wees, S.C.M.** (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **28**: 489-521.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C.** (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **10**: 1571-1580.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., Bakker, P.A.H.M.** (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, **52**: 347-375.
- Pineda, A., Zheng, S-J., Van Loon, J.J.A., Pieterse, C.M.J., Dicke, M.** (2010). Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science*, **15**: 507-514.
- Pomar, F., Bernal, M.A., Collar, J., Díaz, J., Caramelo, C., Gayoso, C., Novo, M., Prego, C., Saavedra, A., Silvar, C., Merino, F.** (2001). A survey of "Tristeza" of pepper in Galicia and the fungal pathogens causing the disease. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, **20**: 90-93.
- Pozo, M.J., Van der Ent, S., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J.** (2008). Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The New Phytologist*, **180**: 511-523.
- Punja, Z.K., Utkhede, R.S.** (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, **21**: 400-407.
- Qiu, Q.S., Liang, H.G.** (1995). Lipid peroxidation caused by the redox system of plasma membranes from wheat roots. *Journal of Plant Physiology*, **145**: 261-265.
- Rasmann, S., De Vos, M., Casteel, C.L., Tian, D., Halitschke, R., Sun, J.Y., Agrawal, A.A., Felton, G.W., Jander, G.** (2012). Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant Physiology*, **158**: 854-863.
- Rawlyer, A., Arpagaus, S., Braendle, R.** (2002). Impact of oxygen stress and energy availability on membrane stability of plant cells. *Annals of Botany*, **90**: 499-507.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J-C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G., Pernollet, J-C.** (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Biochemistry*, **183**: 555-563.
- Ristaino, J.B.** (1991). Influence of rainfall, drip irrigation, and inoculum density on the development of *Phytophthora* root and crown rot epidemics and yield in bell pepper. *Phytopathology*, **81**: 922-929.
- Ristaino, J.B., Hord, M.J., Gumpertz, M.L.** (1992). Population densities of *Phytophthora capsici* in field soils in relation to drip irrigation, rainfall, and disease incidence. *Plant Disease*, **76**: 1017-1024.

- Ristaino, J.B., Johnston, S.A.** (1999). Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Disease*, **83**: 1080-1089.
- Ristaino, J.B., Larkin, R.P., Campbell, C.L.** (1993). Spatial and temporal dynamics of *Phytophthora* epidemics in commercial bell pepper fields. *Phytopathology*, **83**: 1312-1320.
- Sánchez, M.E., Fernández-Rebollo, P., Trapero, A.** (2010). Podredumbre radical de la encina y el alcornoque. En: Jiménez Díaz, R.M., Seguí, E.M. eds, Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. SEF-Phytoma, pp. 135-160.
- San-Segundo, B., Coca, M.** (2004). Genes de defensa. En: Nuez, F., Pérez de la Vega, M., Carrillo, J.M. eds., Resistencia genética a patógenos vegetales. Universidad Politécnica de Valencia, pp. 139-193.
- Santalla M., Fueyo M.A., Rodino A.P., Montero I.** (1999). Breeding for culinary and nutritional quality of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in intercropping systems with maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **3**, 225-229.
- Satur, M.M., Butler, E.E.** (1968). Comparative morphological and physiological studies of the progenies from intraspecific matings of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, **58**: 183-192.
- Schwacke, R., Hager, A.** (1992). Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent of Ca²⁺ and protein kinase activity. *Planta*, **187**: 136-141.
- Shah, J., Zeier, J.** (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 30.
- Silvar, C., Merino, F., Díaz, J.** (2008). Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, **165**: 1120-1124.
- Silvar, C., Merino, F., Diaz, J.** (2009). Resistance in pepper plants induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* involves different defence-related genes. *Plant Biology*, **11**: 68-74.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**: 144-158.
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., Mauch-Mani, B.** (2012). Descendants of primed *Arabidopsis* plant exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiology*, **158**: 835-843.
- Spanu, P.D.** (2012). The genomics of obligate (and nonobligate) biotrophs. *Annual Review of Phytopathology*, **50**: 91-109.
- Stall, R.E., Jones, J.B., Minsavage, G.V.** (2009). Durability of resistance in tomato and pepper to Xanthomonads causing bacterial spot. *Annual Review of Phytopathology*, **47**: 265-284.
- Stein, E., Molitor, A., Kogel, K.H., Waller, F.** (2008). Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant and Cell Physiology*, **49**: 1747-1751.

- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J-P.** (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **35**: 235-270.
- Sumimoto, H.** (2008). Structure, regulation and evolution of NOX-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS Journal*, **275**: 3249-3277.
- Taller, J.** (2006). Gene functioning in pepper. *Acta Agronomica Hungarica*, **54**: 233-269.
- Tamietti, G., Ferraris, L., Matta, A., Gentile, I.A.** (1993). Physiological responses of tomato plants grown in *Fusarium* suppressive soil. *Journal of Phytopathology*, **138**: 66-76.
- Tan, J., Bednarek, P., Liu, J., Schneider, B., Svatos, A., Hahlbrock, K.** (2004). Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry*, **65**: 691-699.
- Torres, M.A., Dangl, J.L.** (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**: 397-403.
- Tyler, B.M.** (2002). Molecular basis of recognition between phytophthora pathogens and their hosts. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 137-167.
- Vallad, G.E., Goodman, R.M.** (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, **44**: 1920-1934.
- Van der Ent, S., Verhagen, B.W.M., Van Doorn, R., Bakker, D., Verlaan, M.G., Pel, M.J., Joosten, R.G., Proveniers, M.C., Van Loon, L.C., Ton, J., Pieterse, C.M.** (2008). MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **146**: 1293-1304.
- Van Loon, L.C.** (1999). Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. En: Datta S.K., Muthukrishnan S. eds, Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press LLC, pp. 1-19.
- Van Wees, S.C.M., De Swart, E.A.M., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J.** (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**: 8711-8716.
- Van Wees, S.C.M., Van der Ent, S., Pieterse, C.M.J.** (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**: 443-448.
- Veloso, J., Díaz, J.** (2012). *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defense genes. *Plant Pathology*, **61**: 281-288.
- Veloso, J., Díaz, J.** (2013). Induced resistance to *Botrytis cinerea* in *Capsicum annuum* by a *Fusarium* crude elicitor fraction, free of proteins. *Plant Biology*, **15**: 1040-1044.
- Veloso, J., García, T., Bernal, A., Díaz, J.** (2014). New bricks on the wall of induced resistance: salicylic acid receptors and transgenerational priming. *European Journal of Plant Pathology*, **138**: 685-693.

- Vera-Estrella, R., Blumwald, E., Higgins, V.J.** (1992). Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells: Evidence for the involvement of active oxygen species. *Plant Physiology*, **99**: 1208-1215.
- Vernooij, B., Uknes, S., Ward, E., Ryals, J.** (1994). Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Cell Biology*, **6**: 275-279.
- Virad, M.P., Martin, F., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.P.** (1994). Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology*, **104**: 1245-1249.
- Vos, C.M., Yang, Y., De Coninck, B., Cammue, B.P.A.** (2014). Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biological Control*, **74**: 65-81.
- Walling, L.L.** (2000). The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, **19**: 195-216.
- 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.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., De Luca, V., Després, C.** (2012). The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Reports*, **1**: 639-647.
- Xue, L., Charest, P.M., Jabaji-Hare, S.H.** (1998). Systemic induction of peroxidase, β -1,3-glucanase, chitinase and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology*, **88**: 359-365.
- Zhang, Y.L., Jia, Q.L., Li, D.W., Wang, J.E., Yin, Y.X., Gong, Z.H.** (2013). Characteristic of the pepper *CaRGA2* gene in defense responses against *Phytophthora capsici* Leonian. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**: 8985-9004.