



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

# **Ensayo del etileno y de una citoquinina como posibles fitosanitarios frente a *Botrytis cinerea* en la planta ornamental *Zinnia elegans***

---

Ensaio do etileno e dunha citocinina como posibles fitosanitarios fronte a *Botrytis cinerea* na planta ornamental *Zinnia elegans*

Assay of ethylene and a cytokinin as potential plant protection products against *Botrytis cinerea* in the ornamental plant *Zinnia elegans*

**Trabajo Fin de Máster**

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

INFORMAN:

Que el presente trabajo de fin de máster titulado:

“Ensayo del etileno y de una citoquinina como posibles fitosanitarios frente a *Botrytis cinerea* en la planta ornamental *Zinnia elegans*”

“Ensaio do etileno e dunha citocinina como posibles fitosanitarios fronte a *Botrytis cinerea* na planta ornamental *Zinnia elegans*”

“Assay of ethylene and a cytokinin as potential plant protection products against *Botrytis cinerea* in the ornamental plant *Zinnia elegans*”

presentado por la graduada CARLOTA REY CASAL ha sido realizado en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Animal, Biología Vexetal e Ecoloxía de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña bajo su dirección, y cumple con las condiciones exigidas para obtener el Máster de Biotecnología Avanzada, 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 28 de Enero de 2016.

DIAZ  
VARELA  
JOSE -  
32782379L

Firmado digitalmente por DIAZ  
VARELA JOSE - 32782379L  
Nombre de reconocimiento (DN):  
c=ES, serialNumber=32782379L,  
sn=DIAZ VARELA,  
givenName=JOSE, cn=DIAZ  
VARELA JOSE - 32782379L  
Fecha: 2016.01.28 16:26:41  
+01'00'

Fdo. José Díaz Varela

VELOSO  
FREIRE  
JAVIER -  
44836782F

Digitally signed by  
VELOSO FREIRE JAVIER -  
44836782F  
DN: c=ES,  
serialNumber=44836782F,  
sn=VELOSO FREIRE,  
givenName=JAVIER,  
cn=VELOSO FREIRE JAVIER  
- 44836782F  
Date: 2016.01.28 15:34:16  
+01'00'

Fdo. Javier Veloso Freire

# ÍNDICE

0. RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Importancia de las enfermedades de las plantas.	1
1.2. Clasificación de los patógenos según su estrategia de ataque.	2
1.3. Patógeno: <i>Botrytis cinerea</i> .	3
1.4. Planta huésped: <i>Zinnia elegans</i> .	5
1.5. Control de enfermedades en cultivos.	6
1.5.1. Concepto de producto fitosanitario. Fungicidas y fitorreguladores.	8
1.6. Mecanismos de defensa de las plantas.	9
1.6.1. Defensa constitutiva e inducida.	9
1.6.2. Defensa física y bioquímica.	10
1.6.2.1. Mecanismos de defensa físicos.	10
1.6.2.2. Mecanismos de defensa bioquímicos.	11
1.6.2.2.1 Proteínas PR: peroxidasa, quitinasa y $\beta$ -1,3 glucanasa.	11
1.7. Resistencia inducida.	12
1.8. Modulación hormonal.	14
1.8.1. Etileno.	15
1.8.2. Citoquininas. 6-Bencilaminopurina.	17
2. OBJETIVOS.	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	21
3.1. Material biológico.	21
3.1.1. Material vegetal: <i>Zinnia elegans</i> .	21
3.1.2. Material fúngico: <i>Botrytis cinerea</i> .	21
3.2. Métodos.	22
3.2.1. Tratamientos.	22
3.2.1.1. Tratamiento con etileno.	22
3.2.1.2. Tratamiento con 6-bencilaminopurina (BAP).	23
3.2.1.3. Tratamiento con el patógeno. Inoculación con <i>Botrytis cinerea</i> .	23
3.3. Toma de muestras para ensayos enzimáticos y de expresión génica.	24
3.4. Ensayos enzimáticos.	25
3.4.1. Extracción de proteínas totales.	25

3.4.2. Medida de proteínas totales.	25
3.4.3. Medida de la actividad $\beta$ -1,3 glucanasa.	25
3.4.4. Medida de la actividad quitinasa.	26
3.4.5. Medida de la actividad peroxidasa.	26
3.5. Ensayos de expresión génica.	26
3.5.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.	26
3.5.2. Medida de la expresión del gen peroxidasa implicado en lignificación ( <i>ZePRX</i> ).	27
3.6. Ensayos de efecto fungicida de la BAP.	27
3.7. Análisis estadístico.	28
4. RESULTADOS.	29
4.1. Efecto del etileno sobre la severidad de la enfermedad.	29
4.2. Efecto de la BAP sobre la severidad de la enfermedad.	29
4.3. Efecto de la BAP sobre marcadores bioquímicos y moleculares de la resistencia.	30
4.3.1. Ensayos anteriores a la inoculación con <i>B. cinerea</i> .	30
4.3.2. Ensayos posteriores a la inoculación con <i>B. cinerea</i> .	31
4.4. Efecto fungicida de la BAP. Crecimiento en placa de <i>B. cinerea</i> .	33
5. DISCUSIÓN.	35
6. CONCLUSIONES.	40
7. BIBLIOGRAFÍA.	41

## 0. RESUMEN

Las plantas cultivadas son atacadas por diferentes plagas y enfermedades que causan pérdidas económicas. Una de ellas es la podredumbre gris, causada por el hongo patógeno necrotrofo *Botrytis cinerea*. Se ha comprobado que algunas fitohormonas pueden provocar un aumento en la resistencia a los patógenos. En el presente trabajo se ensayó la capacidad de protección de dos fitohormonas (etileno y una citoquinina) en la planta ornamental *Zinnia elegans*. Una vez observada la protección que confiere la citoquinina (6-bencilaminopurina) pero no del etileno, se midieron varios marcadores de la defensa de la planta (actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa, peroxidasa y expresión del gen de peroxidasa implicado en lignificación (*ZePRX*)). También se llevaron a cabo ensayos con cultivos del patógeno para comprobar una posible actividad fungicida de la 6-bencilaminopurina. Los resultados mostraron la ausencia de cambios en los componentes de la defensa en las plantas a las que se aplicó bencilaminopurina, con la excepción del gen *ZePRX*, cuya expresión aumentó 42 horas tras la inducción. Asimismo, la bencilaminopurina presentó actividad fungicida. Los resultados apuntan a la acción fungicida de la bencilaminopurina como la causa de la protección observada, aunque también sugieren la necesidad de comprobar la respuesta defensiva de la planta a diferentes tiempos tras la aplicación de la citoquinina.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. Importancia de las enfermedades de las plantas.**

A lo largo de su vida, las plantas interaccionan con numerosos organismos, algunos de los cuales son beneficiosos (rizobacterias promotoras del crecimiento, micorrizas o depredadores de herbívoros), mientras que otros son perjudiciales para las mismas (insectos herbívoros y organismos patógenos) (Van der Ent *et al.*, 2009). Entre los potenciales patógenos de plantas se encuentran varios tipos de microorganismos (bacterias, hongos, protozoos, virus, viroides, mollicutes, nematodos y algas), siendo el grupo más amplio el de los hongos (Trigiano *et al.*, 2008).

El ser humano depende de las plantas y de sus productos en sectores como la alimentación, el textil, el mobiliario, el medio ambiente y en muchos casos, la vivienda. Para millones de personas en todo el mundo que todavía siguen dependiendo de su propia producción agrícola para sobrevivir, las enfermedades en las plantaciones pueden suponer la diferencia entre una vida confortable y la pobreza, o incluso la muerte por inanición. También es importante en regiones cuya economía depende en parte de la producción agrícola, ya que las enfermedades de sus cosechas supondrían pérdidas económicas para los productores y un aumento del precio de los productos para los consumidores (Agrios, 2005).

Normalmente, los agricultores se basan en la aplicación de buenas prácticas agrícolas y el uso de fertilizantes químicos y pesticidas, que han contribuido de manera importante a las espectaculares mejoras en productividad y calidad de los cultivos en el siglo XX. Sin embargo, en la actualidad, la regulación del uso de estos agroquímicos es estricta, debido a que la mala utilización de los mismos puede ocasionar varios problemas: aparición de cepas patógenas con mayor resistencia a los mismos, contaminación del medio ambiente y, en algunos casos, problemas de salud en el ser humano (Pal & Gardener, 2006).

De acuerdo a estas nuevas necesidades socioeconómicas y medioambientales, en los últimos años se ha incrementado la investigación en este campo para buscar productos alternativos a los agroquímicos tradicionales, elaborados a partir de organismos vivos o recursos renovables que sean beneficiosos para el medio ambiente y la salud humana (Álvarez, 2012).

## 1.2. Clasificación de los patógenos según su estrategia de ataque.

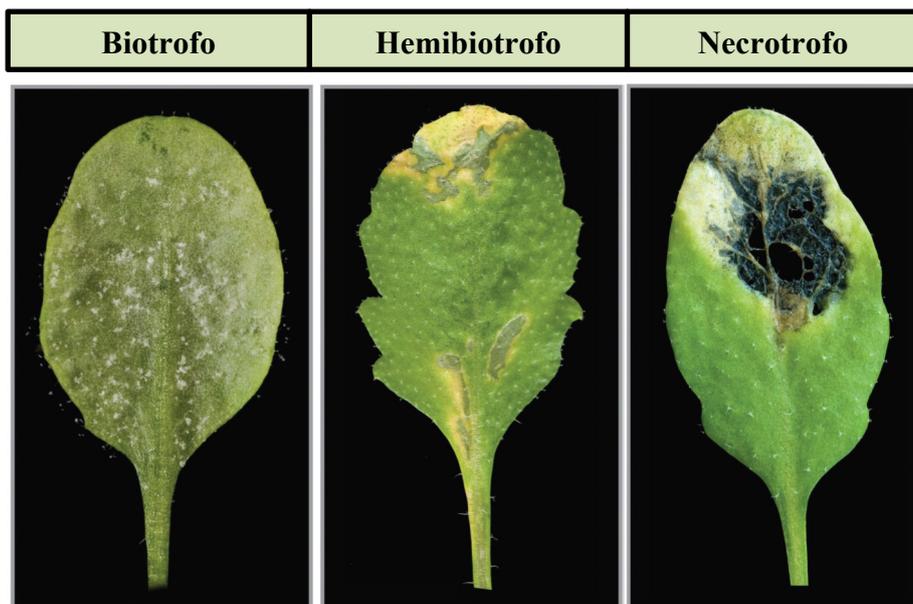
Los patógenos pueden ser clasificados en dos grandes grupos en función de su estrategia de ataque: biotrofos y necrotrofos (Figura 1). Los primeros obtienen los nutrientes de los tejidos vivos de la planta huésped, generalmente a través de haustorios, unas estructuras de alimentación especializadas que penetran en la célula huésped sin interrumpir las funciones de la misma. Los necrotrofos, en cambio, destruyen primero las células huésped (a menudo mediante fitotoxinas producidas por ellos mismos) y luego se alimentan (Pieterse *et al.*, 2009; van der Ent & Pieterse, 2012).

En la siguiente tabla (Tabla 1) se indican sus características principales y aquellas que diferencian un grupo del otro.

**Tabla 1.** Características diferenciales de biotrofos y necrotrofos. Adaptada de Oliver & Ipcho (2004).

<b>BIOTROFOS</b>	<b>NECROTROFOS</b>
Obtienen energía de células vegetales vivas	Obtienen energía de células vegetales muertas
Son patógenos obligados	No son patógenos obligados
Tienen un estrecho rango de hospedadores	Tienen un amplio rango de hospedadores
Secretan pequeñas cantidades de enzimas líticas	Secretan altas cantidades de enzimas degradadoras de pared celular
Están controlados por mecanismos de defensa dependientes del ácido salicílico	Son controlados por mecanismos de defensa dependientes de jasmonato y etileno
Causan pequeños daños en la planta huésped	Causan grandes daños en la planta huésped
Están controlados por genes de resistencia específicos (“ <i>gene-for-gene</i> ”)	Están controlados por genes de resistencia cuantitativos
Poseen haustorios (estructuras de alimentación especializadas)	Producen toxinas

Además de estos dos grupos existe uno intermedio, el de los hemibiotrofos (Figura 1). Estos se caracterizan por mostrar los dos estilos de vida; primero siguen un estilo de vida biotrofo y finalmente cambian a una estrategia necrotrofa (Oliver & Ipcho, 2004).

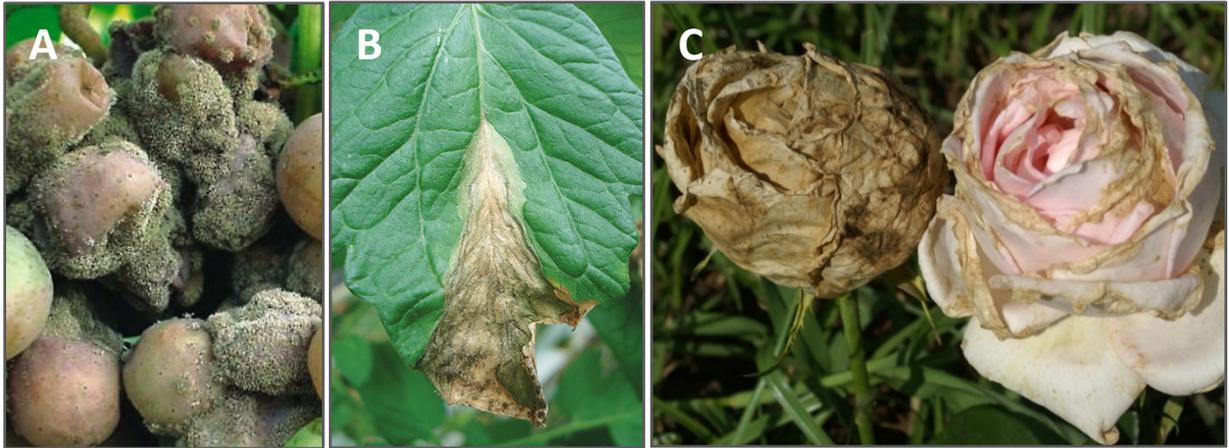


**Figura 1.** Síntomas de las enfermedades en hojas de *Arabidopsis* causadas por: *Hyaloperonospora arabidopsidis* (biotrofo), *Pseudomonas syringae* (hemibiotrofo) y *Botrytis cinerea* (necrotrofo). Adaptada de Pieterse *et al.* (2009).

### 1.3. Patógeno: *Botrytis cinerea*.

*Botrytis cinerea* Pers.:Fr. es un hongo patógeno necrotrofo conocido comúnmente como moho gris, que infecta a más de 240 especies de plantas en todo el mundo (Hahn, 2014). Causa importantes pérdidas económicas, ya sea en plantas o partes de ella, en estado de pre o post-cosecha (van Kan, 2006; El Oirdi *et al.*, 2011). Puede desarrollarse allí donde crezcan sus potenciales plantas hospedadoras, desde zonas tropicales y subtropicales hasta zonas frías (Elad *et al.*, 2004).

El moho gris afecta a muchos cultivos económicamente importantes: verduras y hortalizas (tomate, pepino, brécol, lechuga, judías, zanahoria, patata...), plantas ornamentales (rosa y gerbera), bulbos (cebolla), frutas (uva, fresa, frambuesa, mora, kiwi...). Además, tiene la característica de infectar diferentes órganos de las plantas (hojas, tallo, flores, brotes, frutos...) (Figura 2) (Elad *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Infección por *Botrytis cinerea* en: A) uvas; B) hoja de tomate y C) rosa. Tomadas de:

A) <http://www.agriculturemoderne.com/2015/07/les-maladies-cryptogamique-la.html>

B) <http://www.greenhousecanada.com/inputs/crop-protection/march-april-2014-4022>

C) <http://www.ludwigsroses.co.za/rose-care/botrytis/>

Este hongo se desarrolla bajo condiciones de elevada humedad relativa y temperaturas entre 0 y 25 °C, y se transporta por el aire (Álvarez, 2012). Es más destructivo en tejidos maduros o senescentes, pero a veces aparece en estadios mucho más tempranos, y se mantiene en estado quiescente durante un periodo considerable hasta que las condiciones ambientales para su desarrollo son las idóneas. *B. cinerea* es capaz de crecer con efectividad tras pasar largos periodos de tiempo a temperaturas inmediatamente superiores a la de congelación (Williamson *et al.*, 2007).

Sus hifas pueden penetrar la planta huésped a través de heridas o aperturas naturales, y se propaga desde tejidos muertos previamente colonizados por el hongo hasta nuevos tejidos sanos (El Oirdi *et al.*, 2011).

Muchos fungicidas han fallado en el control de *Botrytis cinerea* debido a varios motivos: su plasticidad genética, su variedad de modos de ataque, su capacidad para contrarrestar la acción tóxica de muchos metabolitos que producen las plantas (por ejemplo, detoxificándolos o secretándolos), la variedad de potenciales hospedadores que puede atacar, su corto ciclo de vida, la abundante cantidad de esporas que produce y su capacidad para sobrevivir en condiciones adversas (van Kan, 2006; Williamson *et al.*, 2007; Hahn, 2014).

Debido a la importancia mundial de *Botrytis cinerea* (por las pérdidas económicas que causa y el resultante interés industrial) y la disponibilidad de herramientas moleculares para estudiarlo, hoy en día se considera el hongo necrotrofo modelo (Williamson *et al*, 2007).

Los motivos de la elección de *Botrytis cinerea* para este trabajo son los siguientes:

- Es un modelo de hongo de estrategia necrotrofa.
- Tiene una gran importancia económica por los daños que causa a nivel mundial.
- Tiene un amplio rango de hospedadores, entre los que se encuentra la planta de estudio (*Zinnia elegans*), de la que hablaremos a continuación.

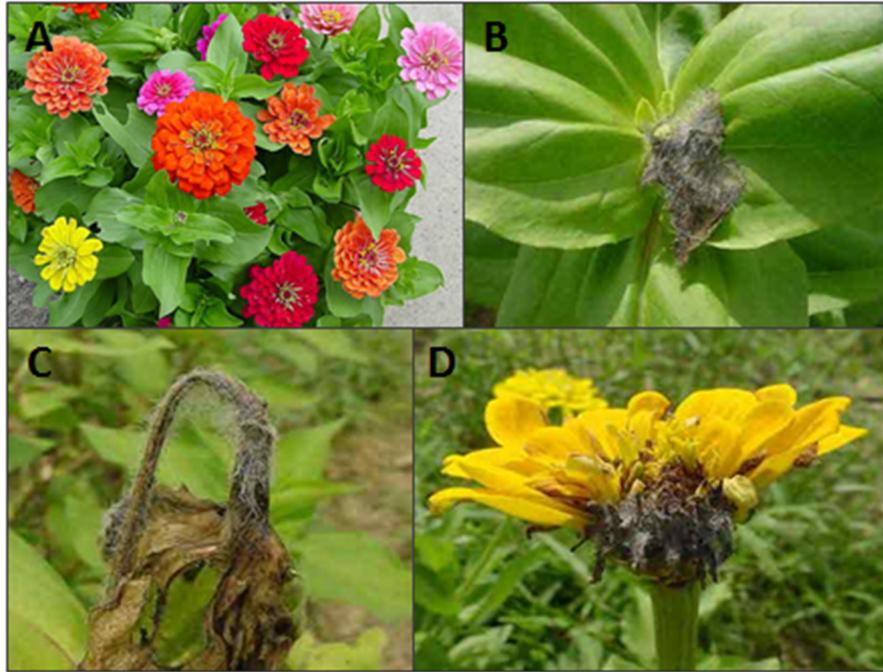
#### **1.4. Planta huésped: *Zinnia elegans*.**

*Zinnia elegans* Jacq. (Figura 3) es una planta herbácea anual de verano (florece desde mediados hasta final de la estación) perteneciente a la familia Asteraceae. El género *Zinnia* se originó en el suroeste de Estados Unidos, México y América Central. Hoy en día es una planta ornamental con mucha importancia debido al alto número de híbridos que se han obtenido e introducido en el mercado (Hegazi & El-Kot, 2010; Kiecana & Mielniczuk, 2010).

Las diversas infecciones que afectan a zinnia causan graves pérdidas en los cultivos. Desde hace años, los fungicidas químicos se han vuelto menos eficaces debido al desarrollo de resistencia por parte de los patógenos (Hegazi & El-Kot, 2010).

Se ha escogido a *Zinnia elegans* como huésped en este estudio por los siguientes motivos:

- Es una planta ornamental comercializada.
- En pocos días llega a crecer para realizar los experimentos biológicos y se infecta con facilidad por *Botrytis cinerea*.
- Es una planta modelo para el estudio de la lignificación, uno de los mecanismos de defensa de las plantas (López-Serrano *et al.*, 2004).



**Figura 3.** A) *Zinnia elegans*. Tomada de <http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/159409/#b>; B, C y D) Diferentes órganos de zinnia infectados por *B. cinerea*: B) yema, C) tallo, D) flor. Tomadas de <https://growingsmallfarms.ces.ncsu.edu/growingsmallfarms-problemezinnia/>

### 1.5. Control de enfermedades en cultivos.

Existen tres modos básicos de control de plagas en cultivos: las prácticas de cultivo, el control químico y el control biológico (Trigiano *et al.*, 2008).

Las prácticas de cultivo ayudan a crear condiciones desfavorables para la aparición de patógenos, disminuyendo la probabilidad de que las plantas entren en contacto con ellos (Agrios, 2005). Cada práctica de cultivo (regímenes de irrigación, zona de plantación, saneamiento, rotación de cultivos, desinfección de las semillas, etc) puede influir en la aparición/magnitud de una enfermedad en una plantación (Agrios, 2005; Trigiano *et al.*, 2008). Una ventaja de las prácticas de cultivo es que pueden implicar la reducción o eliminación de otros tipos de medidas de control (Trigiano *et al.*, 2008).

*Botrytis cinerea* crece óptimamente en condiciones de alta humedad, luz reducida y temperaturas moderadas. Por ello, es adecuado tener un toldo abierto en las plantaciones bajo cubierta, con movimiento de aire y buena intercepción de luz a fin de que las pequeñas gotas de agua de lluvia o irrigación se sequen lo antes posible. También se sabe que un uso excesivo de fertilizantes nitrogenados incrementa el riesgo de infección por el

moho gris y otras enfermedades. Estas son algunas de las prácticas de cultivo que se deben tener en cuenta para evitar el riesgo de infección por *B. cinerea* (Williamson *et al.*, 2007).

El control químico de enfermedades se basa en la utilización de sustancias químicas para matar o inhibir el desarrollo del microbio en alguna etapa del proceso patogénico. La mayoría inhiben el desarrollo de la población de los patógenos (Agris, 2005). Algunas de estas sustancias atacan directamente al patógeno, mientras otras actúan indirectamente, provocando un aumento en la resistencia de las plantas (Trigiano *et al.*, 2008). Las sustancias químicas que atacan directamente al patógeno reciben el nombre de pesticidas o plaguicidas. En el caso específico de los hongos, el control químico se realiza con fungicidas.

Se suele pensar que el control de las enfermedades se puede llevar a cabo tan solo con el uso de pesticidas, pero lo cierto es que el control químico debe ser un componente más de un sistema integrado que también comprenda otras estrategias, como las buenas prácticas de cultivo y el control biológico (Lucas, 1998; Trigiano *et al.*, 2008).

Por su parte, el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos definió el control biológico como el “uso de organismos naturales o modificados, genes o productos de genes, para reducir los efectos de organismos indeseables como patógenos o favorecer los de organismos deseables”. La ventaja principal del control biológico respecto al químico radica en que el primero es menos perjudicial para el medio ambiente y la salud humana. La desventaja que supone este tipo de control es que su eficacia varía en mayor medida que el químico ante cambios en el ambiente, lo cual puede ocasionar un crecimiento más favorable para los organismos patógenos que para los antagonistas utilizados en su control (Pal & Gardener, 2006; Trigiano *et al.*, 2008).

El control de las enfermedades de un cultivo supone costes a mayores en cuestión de materiales y mano de obra. Este coste debe ser cubierto por el aumento en el rendimiento o la disminución de pérdidas en la cosecha que supongan las medidas de control tomadas (Lucas, 1998; Trigiano *et al.*, 2008).

### **1.5.1. Concepto de producto fitosanitario. Fungicidas y fitorreguladores.**

La ley 43/2002 de sanidad vegetal define productos fitosanitarios como: “las sustancias activas y los preparados que contengan una o más sustancias activas presentados en la forma en que se ofrecen para su distribución a los usuarios, destinados a proteger los vegetales o productos vegetales contra las plagas o evitar la acción de éstas, mejorar la conservación de los productos vegetales, destruir los vegetales indeseables o partes de vegetales, o influir en el proceso vital de los mismos de forma distinta a como actúan los nutrientes”.

Los productos fitosanitarios que actúan de forma directa contra el hongo patógeno son los fungicidas. Si un fungicida se usa continuamente, existe la posibilidad de que ciertos individuos de la población de hongos lleguen a ser más resistentes al mismo (por ejemplo, por resultado de una mutación genética) y consigan infectar las plantas, lo cual provoca que estos individuos se multipliquen por selección natural (Walker *et al.*, 2013).

Debido a su plasticidad genética, *Botrytis cinerea* ha sido capaz de desarrollar resistencia a muchos fungicidas que afectan a diferentes dianas: osmorregulación, agentes antimicrotubulares, inhibidores de la biosíntesis de metionina... (Walker *et al.*, 2013). Aún no existe en el mercado un fungicida “definitivo” contra el moho gris y, por ello, es necesario seguir investigando.

Entre los fitosanitarios también se incluyen los fitorreguladores, definidos como sustancias naturales o sintéticas que tienen estructuras análogas a las fitohormonas y efecto hormonal (agonista o antagonista) (Acosta *et al.*, 2011). Los fitorreguladores pueden, por tanto, mejorar la sanidad de los cultivos mediante la inducción de defensas endógenas, es decir, pueden ser inductores de resistencia. Este concepto es interesante para los investigadores, que buscan desarrollar nuevos productos fitorreguladores que sustituyan a las hormonas sintéticas y los pesticidas, que son más tóxicos (Flors, 2000).

La aplicación de productos fitorreguladores puede incrementar la calidad y ocasionalmente la producción en cultivos intensivos. Su uso debe ser utilizado siempre junto a las buenas prácticas agrícolas para conseguir una optimización. Por su baja toxicidad a plantas y animales, los fitorreguladores son buenos candidatos para su uso en agricultura racional (Acosta *et al.*, 2011).

## **1.6. Mecanismos de defensa de las plantas.**

Para poder sobrevivir a los ataques de patógenos, las plantas se han visto obligadas a desarrollar mecanismos de percepción y respuestas de defensa adecuados (Trigiano *et al.*, 2008). A continuación se detallan algunos aspectos de la defensa de las plantas.

### **1.6.1. Defensa constitutiva e inducida.**

Algunos mecanismos de defensa de las plantas ya existen sin necesidad de contacto con los potenciales atacantes, lo que se denomina como defensa constitutiva o pasiva (Figura 4). Las espinas, los tricomas o las acículas son ejemplos de este tipo de defensa frente a herbívoros, mientras que a una escala menor, la pared celular actúa como barrera física para los microorganismos. Además, las plantas producen constitutivamente metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de los microbios o provocan que el tejido sea menos atractivo para los herbívoros (Van der Ent *et al.*, 2009).

Además de la defensa constitutiva, existen otros mecanismos que sólo se activan en presencia del patógeno; estos mecanismos forman parte de la defensa inducida o activa (Figura 4) (Lucas, 1998).

Tras reconocer a un patógeno potencial, se activan muchos eventos de señalización intracelular, incluyendo flujos de iones, activación de cascadas de quinasas y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas señalizaciones tempranas suelen desencadenar varias respuestas de defensa: refuerzo de la pared celular, producción de compuestos antimicrobianos como las proteínas de defensa (PR) o fitoalexinas y la conocida como respuesta hipersensible (HR), una forma localizada de muerte celular programada que permite limitar la expansión del patógeno a lo largo del tejido del huésped (Mishra *et al.*, 2012).

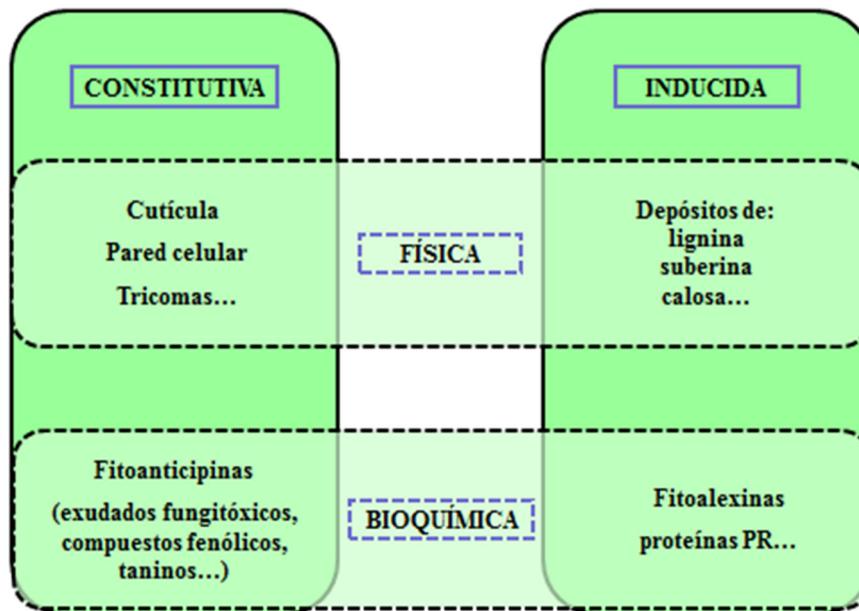


Figura 4. Tipos de mecanismos de defensa de las plantas y algunos ejemplos de cada uno.

## 1.6.2. Defensa física y bioquímica.

### 1.6.2.1. Mecanismos de defensa físicos.

Cada célula vegetal está rodeada por un obstáculo para los patógenos, la pared celular, que forma la defensa física más importante (Lucas, 1998). Además, las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten reforzar y fortificar la misma. Para superar esta barrera, muchos microorganismos producen enzimas de degradación de la pared celular (pectinasas, poligalacturonasas, celulasas...). En respuesta a la aparición del patógeno, algunas plantas producen inhibidores de poligalacturonasas, refuerzan la pared con deposiciones de calosa, sintetizan proteínas ricas en hidroxiprolina que se acumulan en la pared, y aumentan la síntesis de lignina, que también se deposita en la pared y sirve como refuerzo estructural (Nuez *et al.*, 2004).

La lignina es un polímero de compuestos fenilpropanoides altamente ramificado que forma parte de la pared celular, siendo el segundo compuesto más abundante de la misma, tras la celulosa. Sus principales funciones son servir de soporte mecánico para permitir que las plantas se mantengan erguidas, ayudar en el transporte de agua por los vasos del xilema y como defensa frente a patógenos (Moura *et al.*, 2010). El proceso de biosíntesis

de lignina es muy complejo y engloba a una gran cantidad de enzimas, entre las que destacan las peroxidasas (Vanholme *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que debido al ataque fúngico se producen cambios en el contenido de lignina. Además del estrés biótico, el contenido en lignina también puede verse modificado por otras situaciones de estrés abiótico como las bajas temperaturas o la deficiencia de minerales, entre otros (Moura *et al.*, 2010).

#### **1.6.2.2. Mecanismos de defensa bioquímicos.**

Los mecanismos bioquímicos de defensa se basan en la presencia de moléculas no estructurales que tienen algún papel en la defensa de la planta (Figura 4). Ejemplos de ello son las fitoalexinas, las proteínas PR, el estallido oxidativo... (Lucas, 1998).

##### **1.6.2.2.1 Proteínas PR: peroxidasa, quitinasa y $\beta$ -1,3 glucanasa.**

En muchas interacciones de patogénesis con hongos, las plantas producen muchos tipos de proteínas que se cree que tienen una función defensiva: péptidos antifúngicos, tioninas, enzimas hidrolíticas y varias clases de inhibidores enzimáticos. Cuando se da una respuesta hipersensible (HR) se producen las llamadas proteínas PR (“*pathogenesis-related*”) (Lucas, 1998; Agrios, 2005). Éstas son relativamente pequeñas, estables y se acumulan predominantemente en los espacios intercelulares. Su producción puede ser inducida por microorganismos y también por varias sustancias, incluyendo hormonas vegetales como el etileno (Lucas, 1998).

En 1994 se propuso una clasificación de proteínas PR en 11 familias. Esta clasificación se basó en secuencias aminoacídicas, relaciones serológicas y/o enzimáticas o actividad biológica (van Loon & van Strien, 1999). Hoy en día la lista ha aumentado a 17 familias (Sels *et al.*, 2008).

Una de las familias de proteínas PR es la 9, que son peroxidasas implicadas en la síntesis de lignina (Sels *et al.*, 2008). Por lo tanto, si aumenta la actividad peroxidasa en una planta infectada respecto a una que no lo está, podremos concluir que la primera está defendiéndose del ataque del patógeno. Aunque en una planta se detecten bastantes isoenzimas de peroxidasa (en tabaco se han detectado 20), no todas son inducibles por

patógenos (Vidhyasekaran, 2002). En *Zinnia elegans* se estudia la isozima peroxidasa básica involucrada en la biosíntesis de lignina, la ZePRX.

Dado que la quitina y los  $\beta$ -1,3 glucanos son constituyentes importantes de las paredes celulares de hongos, se ha planteado la hipótesis de que las dos enzimas que los hidrolizan (quitinasa y  $\beta$ -1,3 glucanasa, respectivamente) tienen una función en la defensa de las plantas, especialmente sobre patógenos fúngicos (Arshad & Frankenberger, 2002). Ambas enzimas son proteínas PR, y por ello, se incrementa su síntesis en condiciones de patogénesis (Sels *et al.*, 2008).

Las quitinasas comprenden las familias 3, 4, 8 y 11 de las proteínas PR (Sels *et al.*, 2008). Son enzimas que hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 de los polímeros formados por residuos de N-acetilglucosamina, principalmente de la quitina (Kasprzewska, 2003). Son proteínas monoméricas que incluyen tanto proteínas ácidas (secretadas al exterior de las células) como básicas (vacuolares). Algunas de ellas se expresan en tejidos concretos de manera independiente a la infección (Nuez *et al.*, 2004). Se sabe que algunas quitinasas intervienen también en procesos de crecimiento y desarrollo de plantas y animales (Kasprzewska, 2003).

Las  $\beta$ -1,3 glucanasas pertenecen a la familia 2 de las proteínas PR. Se trata de enzimas que rompen enlaces  $\beta$ -1,3-D-glucosídicos en las moléculas de  $\beta$ -1,3 glucanos. Son enzimas abundantes y extensamente distribuidas entre las plantas con semilla. Además de intervenir en las respuestas de las plantas a condiciones de estrés, las  $\beta$ -1,3 glucanasas también tienen un papel en otros procesos de desarrollo (germinación del polen, fertilización, maduración del fruto, etc.) (Leubner-Metzger & Meins, 1999).

Las quitinasas y las  $\beta$ -1,3 glucanasas pueden actuar tanto de forma directa (degradando la pared del patógeno) como indirectamente (provocando la liberación de compuestos de la pared del mismo, que actuarían como inductores de respuestas de defensa de la planta) (Nuez *et al.*, 2004).

### **1.7. Resistencia inducida.**

Además de la defensa local, las plantas pueden activar otra línea de defensa, conocida como resistencia inducida, la cual está caracterizada por su efectividad ante un amplio

espectro de atacantes. La propiedad más importante de este tipo de defensa es que, además de en el tejido atacado, también actúa a nivel sistémico (toda la planta), lo que permite protegerla de posteriores invasores (Van der Ent *et al.*, 2009).

Con la resistencia inducida se potencia la resistencia propia de la planta, llevándola a un nivel superior (Zeller, 2006). Esto se consigue al poner en contacto a la planta con los llamados inductores de resistencia, agentes tanto bióticos como abióticos. La resistencia inducida normalmente es efectiva ante un amplio espectro de invasores y puede ser duradera en el tiempo; pero raramente es una resistencia completa. Por lo general implica una reducción de enfermedad entre el 20 y el 85%. (Walters *et al.*, 2013).

La resistencia inducida se subdivide en dos grandes grupos. En primer lugar, la resistencia sistémica adquirida (SAR), desarrollada local o sistémicamente en respuesta a un patógeno que cause lesión necrótica o HR (Figura 6). En la SAR se producen proteínas PR y está mediada por la vía de defensa dependiente del ácido salicílico (SA), una fitohormona de la que hablaremos a continuación. En segundo lugar, la resistencia sistémica inducida (ISR), que se desarrolla sistémicamente sin implicar la expresión de proteínas PR y mediada por la vía de defensa dependiente del jasmonato y el etileno, otras hormonas que se tratarán más adelante (Zeller, 2006). El factor desencadenante de la ISR es habitualmente la colonización de raíces por parte de microorganismos beneficiosos del suelo, como los hongos micorrícicos o las rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (Pieterse *et al.*, 2009).

La inducción de resistencia puede dar lugar al “*priming*” de las células, que resulta en una elicitación más fuerte de las defensas en posteriores ataques (Walters *et al.*, 2013).

Los agentes inductores son muy variados y pueden dividirse en dos grupos: agentes biológicos y químicos. Ejemplos de agentes inductores de origen biológico son los hongos micorrícicos, las rizobacterias y los hongos promotores del crecimiento de la planta, los extractos y elicitores algales, etc. Por su parte, algunos ejemplos de agentes inductores químicos son: el Acibenzolar-S-metil (ASM), el ácido  $\beta$ -aminobutírico (BABA), el probenazol, la sacarina, la tiamina, etc (Walters *et al.*, 2013). Entre los posibles agentes inductores se incluirían los productos sanitarios con actividad hormonal, es decir, los fitorreguladores.



**Figura 6.** Principio de la SAR. Una hoja tratada con sustancias químicas u organismos inductores que causen una lesión necrótica y estimulen la señalización encaminada por el SA, que es transportado al resto de la planta, donde se activarán los mecanismos de defensa para posteriores infecciones.

### 1.8. Modulación hormonal.

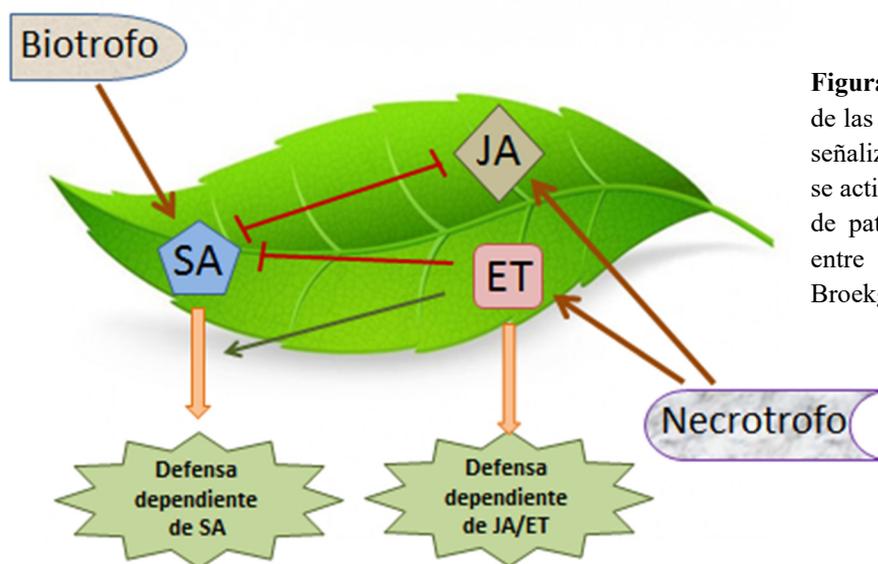
Una fitohormona puede definirse como: producto de naturaleza orgánica y origen natural presente en las plantas que actúa a bajas concentraciones, modificando el desarrollo de las plantas (Acosta *et al.*, 2011).

La señalización de respuesta de una planta al ataque de un patógeno está regulada principalmente por tres hormonas clave: el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico o jasmonato (JA) y el etileno (ET) (Denancé *et al.*, 2013). Éstas provocan una cascada de eventos que van a activar la defensa de la planta. Existen dos vías principales de señalización que son más o menos efectivas dependiendo de la clase de patógeno al que se enfrenten: generalmente, los patógenos biotrofos son más sensibles a las defensas inducidas por la señalización del SA, mientras los necrotrofos y los herbívoros lo son con las defensas mediadas por el JA y el ET (Figura 7) (Koornneef *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2012; Denancé *et al.*, 2013).

En la naturaleza, las plantas a menudo interaccionan simultánea o secuencialmente con diferentes tipos de patógenos, lo que significa un problema para las mismas, ya que hay amplia evidencia de que existe una relación antagónica mutua entre la vía dependiente del JA y la del SA (Figura 7) (Koornneef *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2012), lo que

provocaría la susceptibilidad ante la aparición de un necrotrofo si la planta se está defendiendo vía SA de un biotrofo y la susceptibilidad a un biotrofo si la planta se está defendiendo vía JA de un necrotrofo.

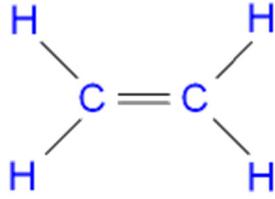
Más recientemente se ha descubierto que, además de las anteriores, las hormonas que promueven el crecimiento de las plantas (ácido abscísico, auxinas, brasinoesteroides, citoquininas y giberelinas) inhiben o potencian este equilibrio e influyen en la resistencia de las plantas a los patógenos (Naseem & Dandekar, 2012; Nafisi *et al.*, 2015).



**Figura 7.** Esquema general de las dos principales vías de señalización hormonal que se activan en función del tipo de patógeno e interacciones entre ellas. Adaptada de Broekgaarden *et al.*, 2015.

### 1.8.1. Etileno.

El etileno (Figura 8) es una hormona vegetal gaseosa de fórmula molecular muy simple ( $C_2H_4$ ) y de bajo peso molecular (28,05 g/mol) involucrada en la regulación de muchas respuestas fisiológicas. Inicialmente denominada la “hormona de la maduración”, está implicada en casi todos los procesos de crecimiento y desarrollo, desde la germinación de las semillas hasta la senescencia de varios órganos, además de intervenir en muchas respuestas al estrés abiótico (Arshad & Frankenberger, 2002; NCBI, PubChem).



**Figura 8.** Estructura del etileno. Tomada de <http://www.gcsescience.com/o15.htm>

Esta hormona se produce en casi todos los órganos de la planta, pero la magnitud de síntesis de la misma aumenta con heridas y otros tipos de estrés, y durante la maduración de los frutos, la senescencia y la abscisión (Jones *et al.*, 2013).

El etileno también tiene un papel importante en las interacciones con organismos tanto patógenos como beneficiosos. En las interacciones de patogénesis, se ha demostrado que esta fitohormona regula tanto la respuesta primaria de las plantas huésped como las respuestas sistémicas, y que actúa principalmente frente a patógenos necrotrofos, como *Botrytis cinerea* (van der Ent & Pieterse, 2012; Broekgaarden *et al.*, 2015).

Se ha visto en diferentes estudios que la aplicación exógena de la hormona induce resistencia, susceptibilidad o no tiene ningún efecto, dependiendo de la interacción planta-patógeno que se estudie. Se ha visto que cuando el etileno se aplica antes de la inoculación de la planta con el patógeno, la enfermedad disminuye o es la misma que en condiciones normales; en cambio, si el etileno se aplica tras la inoculación, se acelera el desarrollo de la enfermedad (van Loon *et al.*, 2006).

El etileno actúa como una molécula señal inductora de varios genes relacionados con la defensa: fitoalexinas, proteínas PR, alteraciones en la pared celular... (Díaz *et al.*, 2002; Vidhyasekaran, 2002).

Hay varios casos de estudio que afirman que el etileno induce resistencia. Por ejemplo, Díaz y colaboradores observaron que el etileno disminuye la susceptibilidad a *B. cinerea* en tomate (Díaz *et al.*, 2002). Belhadj y colaboradores descubrieron que el tratamiento de plantas de la vid (*Vitis vinífera*, un huésped potencial de *B. cinerea*) con etefón (una sustancia química que en la planta libera etileno) induce un aumento de proteínas PR y de fitoalexinas, y que el etefón aumenta la protección de la vid frente a *Erysiphe necator* (Belhadj *et al.*, 2008). Además, se ha visto que el etileno juega un papel esencial en la resistencia de la planta modelo *Arabidopsis* frente a *B. cinerea*, el hongo objeto de nuestro estudio (Thomma *et al.*, 1999).

### 1.8.2. Citoquininas. 6-Bencilaminopurina.

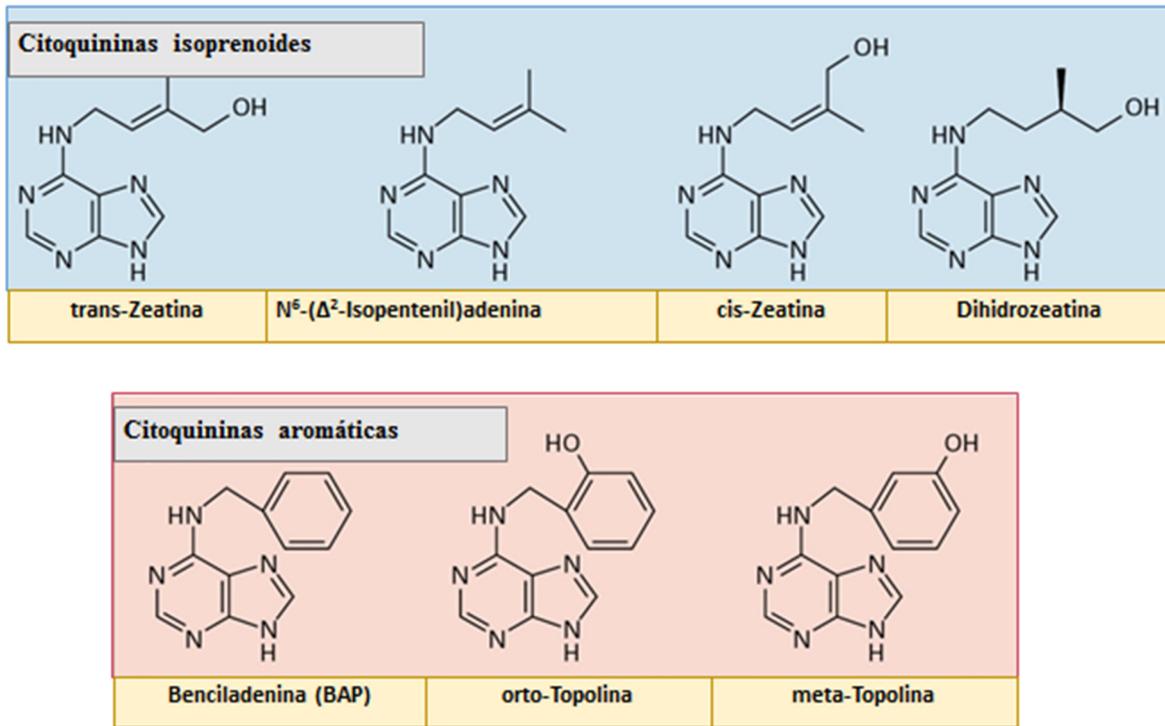
Las citoquininas son una familia de fitohormonas derivadas de la adenina e implicadas en diversos mecanismos de regulación de muchos procesos fisiológicos y de desarrollo de la planta, como la división y diferenciación celular, la senescencia foliar, la nodulación, la movilización de nutrientes, las respuestas a la luz, la dominancia apical o la germinación de las semillas (Großkinsky *et al.*, 2011; Naseem *et al.*, 2014).

Las citoquininas pueden ser tanto naturales (sintetizadas por las plantas) como sintéticas. Las primeras se pueden clasificar en dos categorías según la estructura de la cadena lateral que va unida a la posición 6 de la purina (Figura 9): citoquininas aromáticas e isoprenoides (Jones *et al.*, 2013).

Recientemente se ha demostrado que las citoquininas están involucradas en las interacciones huésped-patógeno, pero este aspecto no ha sido ampliamente estudiado hasta el momento (Mishra *et al.*, 2008; Nafisi *et al.*, 2015). A pesar de ello, se ha demostrado que las mismas promueven la resistencia de las plantas ante diferentes patógenos, tanto bio como hemibio o necrotrofos (*Alternaria brassicicola*, *Botrytis fabae*, *Botrytis cinerea* o *Pseudomonas syringae*) (Moore & Leach, 1968; Choi *et al.*, 2010, Großkinsky *et al.*, 2011; Nafisi *et al.*, 2015). También promueven la resistencia contra virus (mosaico del tabaco, virus de la necrosis) y herbívoros (Naseem & Dandekar, 2012; Naseem *et al.*, 2015)

Se ha observado que las citoquininas modulan la señalización de respuestas de defensa dependientes del SA y el JA. Sin embargo, todavía queda mucho por conocer sobre los mecanismos que subyacen estas interacciones (Naseem *et al.*, 2014).

Las citoquininas juegan un papel importante en la coordinación del programa genético que regula la senescencia de los tejidos de las plantas. Los patógenos biotrofos inducen una mayor producción de citoquininas porque necesitan que las células de la planta sigan vivas. Los necrotrofos, en cambio, destruyen el tejido de la planta a través de toxinas y enzimas de degradación de la pared celular para conseguir nutrientes (Barna *et al.*, 2008).



**Figura 9.** Estructura de algunas citoquininas. Adaptada de Buchanan *et al.* (2015).

Diversos patógenos microbianos tienen la capacidad de producir citoquininas que modulan la inmunidad de las plantas. Se ha demostrado que la producción de citoquininas es esencial en varios patógenos para que se lleve a cabo la infección (Großkinsky *et al.*, 2008).

*Botrytis cinerea*, al igual que los demás hongos necrotrofos, no produce citoquininas. Choi y colaboradores han descubierto que las citoquininas promueven (mediante modulación de la señalización de defensa) la resistencia de plantas a patógenos que no las secretan, como es el caso de *B. cinerea* (Choi *et al.*, 2010).

Barna y colaboradores observaron que la sobreproducción de citoquininas en tabaco (inducida por la expresión del gen de biosíntesis de citoquinina, el gen *ipt*) parece suprimir los síntomas de respuesta hipersensible inducidas por bacterias incompatibles con la planta. Esta reducción de la HR probablemente se debe, al menos en parte, a una mayor capacidad antioxidante del tejido y una composición lipídica de membrana más estable en el mismo (Barna *et al.*, 2008).

Las plantas sintetizan varias formas de citoquininas: quinetina, zeatina y benciladenina o 6-bencilaminopurina (BAP) (Nafisi *et al.*, 2015). En este trabajo hemos utilizado como agente inductor/fungicida la 6-bencilaminopurina (Figura 9), de bajo peso molecular (225,26 g/mol) y fórmula molecular C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub> (NCBI, PubChem).

Se ha visto que las citoquininas inducen la actividad peroxidasa en *Zinnia elegans* (Gutiérrez *et al.*, 2009). A partir de esto se extrae la hipótesis de que la aplicación exógena de esta fitohormona aumentará la expresión del gen que codifica para la isozima *ZePrx* (Gutiérrez *et al.*, 2009). Por tanto, podría aumentar la lignificación y con ello, la resistencia de la planta a los patógenos.

Además, Mishra y colaboradores han observado que la BAP inhibe el crecimiento de *Phytophthora colocasiae*, es decir, que tiene un efecto fungicida (Mishra *et al.*, 2008).

Por todo lo expuesto hasta ahora podemos plantear la hipótesis de que tanto el etileno como la bencilaminopurina pueden actuar como inductores de resistencia en la planta ornamental *Zinnia elegans* frente *Botrytis cinerea*. Además, debido a que en la actualidad el uso de estas sustancias está permitido para determinadas aplicaciones agrícolas, no es arriesgado pensar que podría aprobarse el uso de las mismas para controlar la enfermedad del moho gris en diferentes cultivos.

## **2. OBJETIVOS.**

Los objetivos que hemos perseguido en este Trabajo de Fin de Máster son los siguientes:

1. Comprobar si la aplicación de etileno y de una citoquinina (la bencilaminopurina) son capaces de proteger a *Zinnia elegans* frente a la infección por *Botrytis cinerea*.
2. Estudiar posibles mecanismos fisiológicos de resistencia inducida que expliquen la protección observada.
3. Estudiar posibles efectos fungicidas/fungistáticos que expliquen la protección observada.

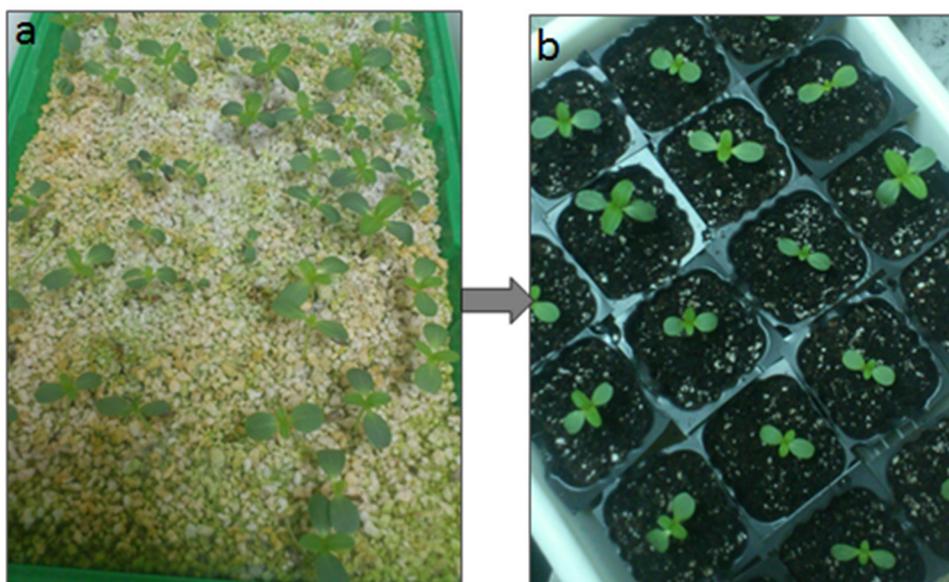
### 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1. Material biológico.

##### 3.1.1. Material vegetal: *Zinnia elegans*.

Los bioensayos comenzaron con la siembra de semillas de *Zinnia elegans* (cv Envy, Chiltern Seeds, Cumbria, England) en un sustrato de perlita regado con solución nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950). Las semillas sembradas se incubaron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 h de luz a una temperatura de 25°C y 8 h de oscuridad a 18°C.

Tras una semana de incubación, las plantas de zinnia se transplantaron a pequeñas macetas con una mezcla 1:2 (v/v) de perlita y tierra vegetal (Figura 10). Tras ello se mantuvieron durante tres días en la cámara de incubación con las condiciones anteriores.



**Figura 10.** Plantas de *Zinnia elegans* en perlita (a) y posterior trasplante (b).

##### 3.1.2. Material fúngico: *Botrytis cinerea*.

Para este trabajo se utilizó el aislado B0510 de *B. cinerea*. El mismo fue cedido por el Dr. Van Kan (Wageningen University, Países Bajos). Se repicaron cuadrados de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de un cultivo del hongo a nuevas placas con medio de cultivo

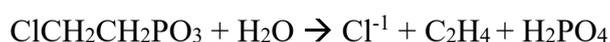
PDA (patata, dextrosa y agar) y se cultivaron a 23°C y en oscuridad permanente durante cinco días. Para la inoculación se tomaron discos de micelio de este cultivo.

## **3.2. Métodos.**

### **3.2.1. Tratamientos.**

#### **3.2.1.1. Tratamiento con etileno.**

Debido a la dificultad de manejo que implica el etileno por su naturaleza gaseosa, en este Trabajo Fin de Máster hemos utilizamos el etefón (ácido 2- cloroetilfosfónico, ClCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>). El etefón se descompone en etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) en disoluciones con pH básico, de acuerdo con la siguiente reacción:

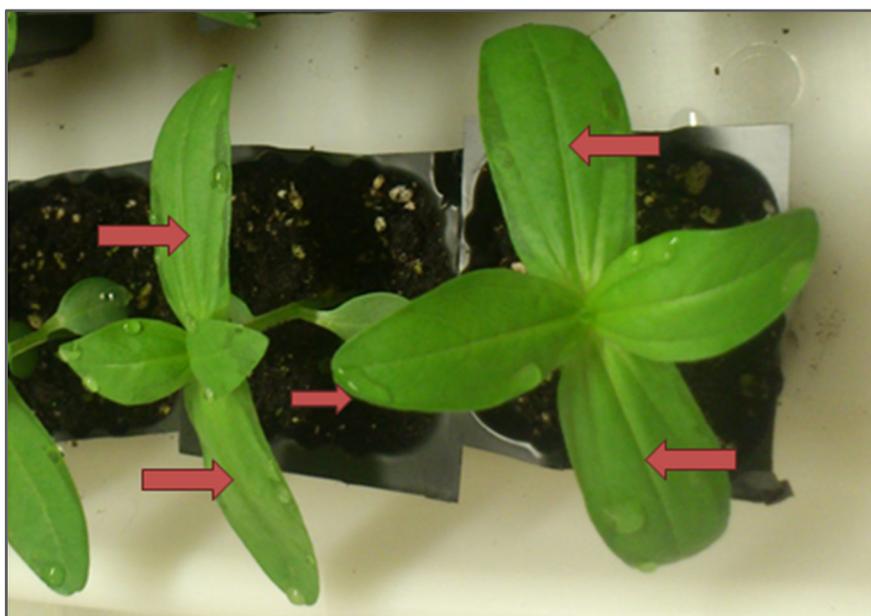


Para nuestros ensayos se preparó una solución de etefón 0,533 g/L en fosfato disódico 0,5 M en una botella cerrada con un septo en el tapón. Ello nos permite obtener una fase gaseosa con una concentración conocida de etileno (Zhang & Wen, 2010). Con una jeringuilla se recogía a través del septo un volumen determinado del aire contenido en la fase gaseosa de la botella. Este aire contenía el etileno desprendido de la descomposición del etefón.

Este etileno gaseoso fue posteriormente inyectado en cajas cerradas herméticamente para evitar salidas o entradas de gases. Se añadió el volumen necesario del stock gaseoso de etileno a través de un septo en la caja, alcanzando la concentración final de 1 ppm (Díaz *et al.*, 2002). En el interior de las cajas se dispusieron previamente las plantas de zinnia. En la caja del control se añadieron 100 mg de permanganato potásico para absorber los excesos de etileno y así evitar que haya una alta acumulación de esta hormona, que pudiera influir en la resistencia de las plantas en el control no tratado. Las plantas se mantuvieron en las cajas con etileno durante 24 horas.

### 3.2.1.2. Tratamiento con 6-bencilaminopurina (BAP).

Para la inducción por BAP se pulverizaron las dos primeras hojas verdaderas de cada planta de zinnia con 5 ml de una solución de BAP 50  $\mu$ M en dimetilsulfóxido 0,05% (Figura 11). Las plantas control fueron pulverizadas con 5 ml de dimetilsulfóxido 0,05%.



**Figura 11.** Puntos de aplicación de la BAP. Primeras hojas verdaderas de *Zinnia elegans*.

### 3.2.1.3. Tratamiento con el patógeno. Inoculación con *Botrytis cinerea*.

24 horas tras la aplicación de la BAP o del etileno, las plantas se inocularon con discos de micelio de 5 mm de diámetro de las zonas en crecimiento activo de los cultivos en placa de *B. cinerea*. Los discos se pegaron al haz de las hojas donde se realizó la inducción. El proceso se facilitó mojando previamente los discos en agua destilada autoclavada. Luego, se incubaron las plantas de cada tratamiento a temperatura ambiente en cajas de plástico cerradas con una capa de aproximadamente un centímetro de agua y papel de filtro que ayudase a mantener una humedad ambiental elevada (Figura 12), condición que, como vimos anteriormente, favorece la infección por *Botrytis cinerea*.



**Figura 12.** Incubación de *Z. elegans* inoculada con *B. cinerea*.

Se hizo un seguimiento de la enfermedad, pasadas 48 horas en los ensayos con etileno, y 42 horas los ensayos con BAP, midiendo el diámetro de las lesiones (ya que el crecimiento de la zona infectada era generalmente circular).

Para estudiar el efecto del etileno se realizaron dos experimentos independientes, cada uno con 6-8 plantas por tratamiento (control inoculado con *B. cinerea* y tratamiento con etileno inoculado con *B. cinerea*). Para estudiar el efecto de la BAP se realizaron dos experimentos independientes, cada uno con 6-7 plantas por tratamiento (control inoculado con *B. cinerea* y tratamiento con BAP inoculado con *B. cinerea*).

### **3.3. Toma de muestras para ensayos enzimáticos y de expresión génica.**

Para la recogida de muestras se llevaron a cabo 4 experimentos independientes y con la misma metodología que los bioensayos. Pero, en este caso, se tomaron muestras de las hojas enteras de cada grupo (control y BAP, ambos sin inocular) 24 h tras la inducción, y 18 h tras la inoculación (42 h tras la inducción) de cada tratamiento (control sin inocular, control inoculado, BAP sin inocular y BAP inoculado). Las muestras se almacenaron en un congelador a -80°C inmediatamente tras ser pesadas.

Las muestras congeladas fueron posteriormente homogenizadas en un mortero con nitrógeno líquido, y separadas en alícuotas de 200 mg para la extracción de proteínas y de 60 mg para extracción de RNA. Todo este proceso se realiza en nitrógeno líquido para

evitar la descongelación de las muestras y, por tanto, la posible pérdida de actividades enzimáticas o de RNA por degradación.

### **3.4. Ensayos enzimáticos.**

#### **3.4.1. Extracción de proteínas totales.**

Se tomaron 200 mg de las muestras previamente homogenizadas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se resuspendieron en 1 ml de tampón Tris HCl 50 mM + KCl 1M pH 7,5 con 10 mg de PVPP (polivinilpolipirrolidona). Las mezclas se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$  y 12857 xg durante 20 min. El sobrenadante se separó en alícuotas de 400  $\mu\text{l}$ , que se almacenaron en el congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Todo el proceso se realizó en frío.

#### **3.4.2. Medida de proteínas totales.**

La medida de proteínas totales se realizó por el método de Stoscheck (1990). En primer lugar se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad una mezcla con 900  $\mu\text{l}$  de reactivo Bradford, 50  $\mu\text{l}$  de NaOH 1M, 45  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 5  $\mu\text{l}$  de muestra de las alícuotas. Posteriormente se midió la absorbancia a 590 nm frente a un blanco en el que se sustituyó de la mezcla el volumen de muestra por  $\text{H}_2\text{O}$ . Se usó una recta de calibrado para obtener los valores de concentración de proteínas en cada muestra.

#### **3.4.3. Medida de la actividad $\beta$ -1,3 glucanasa.**

La actividad de la enzima  $\beta$ -1,3 glucanasa se cuantificó mediante una modificación del método de Imanaka *et al.* (2001), utilizando laminarina como sustrato de la reacción.

Se preincubaron las mezclas de reacción (332,5  $\mu\text{l}$  de tampón acetato sódico 100 mM pH 5 y 82,5  $\mu\text{l}$  de laminarina al 1%, (L9634-1g, Sigma) en eppendorfs a  $37^{\circ}\text{C}$  mientras se descongelaban las alícuotas de muestras en hielo. Se añadieron 85  $\mu\text{l}$  de muestra a cada eppendorf y se incubaron durante 10 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Inmediatamente se transfirieron los tubos a un baño de hielo durante 5 minutos. Luego se añadieron 670  $\mu\text{l}$  de Ferricianuro potásico 1,5 mM en carbonato sódico 0,5 M y se incubaron en un bloque térmico a 100

°C durante 15 minutos. Pasado ese tiempo se transfirieron las mezclas a un baño de hielo durante 5 minutos y se midieron las absorbancias a 420 nm. Los valores obtenidos se sustituyeron en la función de una recta de calibrado realizada con glucosa. Los datos se expresaron en mU/mg de proteína. Una unidad internacional (U) de actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasa se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de producto por minuto.

#### **3.4.4. Medida de la actividad quitinasa.**

La medida de la actividad quitinasa se realizó mediante el método de Imanaka *et al.* (2001); es decir, el mismo que para la  $\beta$ -1,3 glucanasa, pero con glicol-quitina al 1% como sustrato de la reacción. Consúltese el apartado anterior para una descripción detallada. Los datos se expresaron en mU/mg de proteína.

#### **3.4.5. Medida de la actividad peroxidasa.**

Se mezclaron 890  $\mu$ l de Tampón Tris HCl pH 7,5, 10  $\mu$ l de 4MN (4-metoxinaftol) 100 mM, 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM y 50  $\mu$ l de muestra, e inmediatamente se midieron los incrementos de absorbancia por minuto a 593nm. Los valores obtenidos se utilizaron para calcular la actividad peroxidasa de cada muestra, utilizando un  $\epsilon_{593}=21 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Los datos se expresaron en U/mg proteína.

### **3.5. Ensayos de expresión génica.**

#### **3.5.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.**

Las muestras de 60 mg se utilizaron para la extracción del RNA, que se realizó siguiendo el protocolo del kit BioRad Aurum<sup>TM</sup> Total RNA Mini kit.

Posteriormente se cuantificó la cantidad de RNA presente en las muestras con ayuda de un espectrofotómetro (Helios  $\gamma$ , Thermo) y se procedió a la síntesis de cDNA siguiendo el protocolo del kit iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis kit.

### 3.5.2. Medida de la expresión del gen peroxidasa implicado en lignificación (*ZePRX*).

Para medir la expresión del gen de la enzima peroxidasa implicada en lignificación (*ZePRX*), se usó el cDNA para realizar una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). La qPCR se realizó con el siguiente programa: 95°C 2 min, 40 ciclos de (95°C 20seg, 58°C 25seg y 72°C 50seg) y un último paso de 72°C 5 min.

La qPCR fue realizada por el SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de A Coruña. Se amplificaron el gen de la peroxidasa (*ZePRX*) (ref. NCBI: AJ880392) y tres genes de tubulina a la vez (*ZeTubB1,2,3*) (ref. NCBI: D63136, D63137 y D63138), tomados como referencia por su conocida estabilidad en niveles de expresión en diferentes condiciones fisiológicas de la planta. Los *primers* utilizados para la amplificación de los genes *ZePRX* y *ZeTubB1,2,3* (Tabla 2) fueron previamente descritos por Gómez-Ros *et al.* (2012).

**Tabla 2.** Cebadores utilizados para la QRT-PCR.

		Cebador		
Gen	Nº de acceso	Nombre	Secuencia	Amplición
<i>ZePrx</i>	AJ880392-5	Ze266FW	5'-TCGACAACAACACTACTACAGGG-3'	216 pb
		Ze266RV	5'-GATTACCGCAAAGAGTCCTT-3'	
<i>β-tubulina</i>	D63136	ZeBTubFW	5'-CAAGGCGGCCAATGCGGCAACCA-3'	284 pb
	D63137	ZeBTubRV	5'-GCCCAATTATTACCAGCACCA-3'	
	D63138			

Para el análisis y la obtención de los valores de Ct se utilizó el software iCycler iQ System. Se siguió el modelo descrito por Pfaffl (2001) para el cálculo de los niveles de expresión relativa de cada uno de los genes. Los resultados obtenidos sirvieron para comparar los niveles de expresión de este gen en cada tratamiento.

### 3.6. Ensayos de efecto fungicida de la BAP.

Se realizaron dos ensayos de crecimiento de *B. cinerea* en placa Petri con medio PDA suplementado con bencilaminopurina (BAP) y/o un fungicida comercial. Como referencia de este estudio se utilizó el fungicida SCALA 400 SC, cuya sustancia activa es

el pirimetanil (PIRI), un fungicida de uso común para combatir las enfermedades causadas por *Botrytis*.

Se prepararon 500  $\mu$ l de una solución *stock* en dimetilsulfóxido (DMSO) de BAP y/o PIRI y se añadieron a 100 ml de medio PDA. Se utilizaron concentraciones finales de 50 $\mu$ M de BAP y 25 $\mu$ M y 250 $\mu$ M de PIRI. Para las placas Petri control se añadieron 500 $\mu$ l de DMSO. Se realizaron un total de 6 tratamientos: Control, PIRI 25 $\mu$ M, PIRI 250 $\mu$ M, BAP, BAP+PIRI 25 $\mu$ M y BAP+PIRI 250 $\mu$ M.

Las placas fueron sembradas con discos de micelio de 5 mm de la cepa B0510 de *B. cinerea*. Las placas fueron incubadas durante tres días a temperatura ambiente y en oscuridad.

Se midieron los diámetros de expansión del hongo pasadas 48 y 72 h tras la siembra.

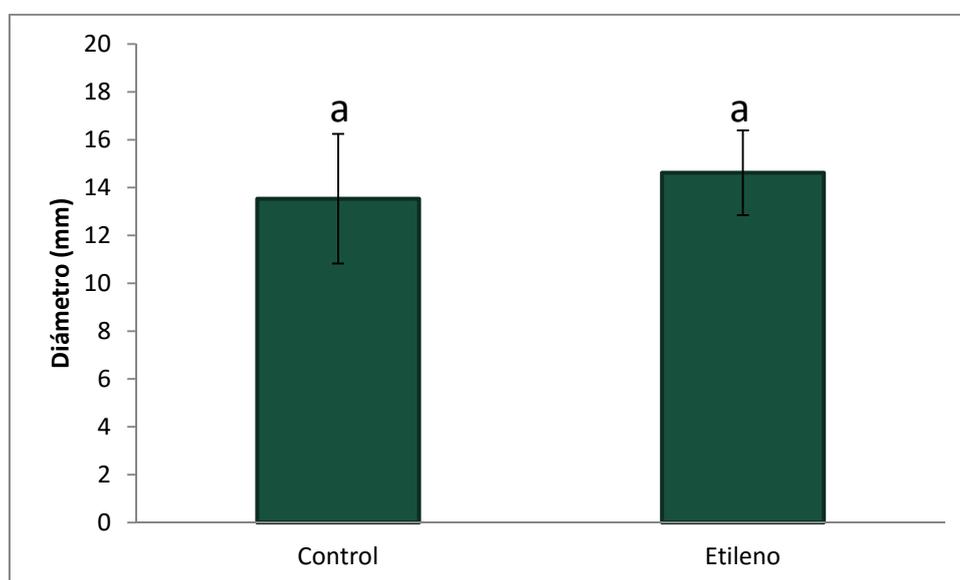
### **3.7. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se ha realizado con el programa Statgraphics 5.1. Los datos obtenidos de los ensayos de severidad de este trabajo se han analizado con test Kruskal-Wallis. Las medidas de actividades enzimáticas y la expresión del gen *ZePRX* en las muestras de zinnia de 24 horas tras la aplicación de BAP han sido analizadas con el mismo test, Kruskal-Wallis. Por su parte, las medidas enzimáticas y de expresión en las muestras de zinnia de 42 horas tras la aplicación de BAP se han analizado con un test Anova de dos vías. Por último, los datos de medición del crecimiento de *Botrytis cinerea* en placa Petri han sido analizados con test Anova y Duncan. En todos los casos se ha aplicado un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Efecto del etileno sobre la severidad de la enfermedad.

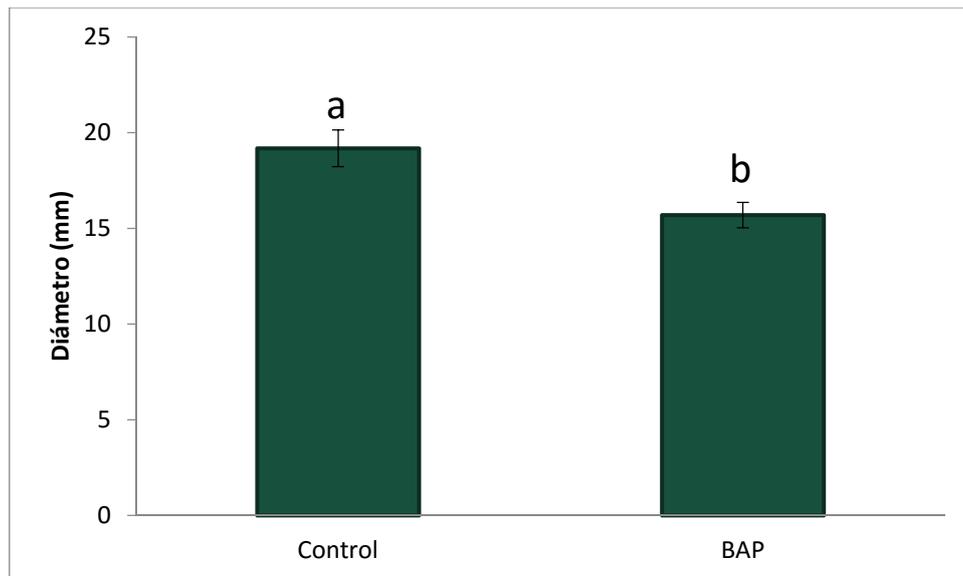
La severidad de una infección indica la intensidad del ataque de un patógeno en el huésped. Una forma de medir la intensidad de la infección es con los diámetros de expansión de las lesiones, ya que los discos de micelio son redondos y el crecimiento concéntrico. Se han comparado los diámetros de expansión a las 48 h tras la inoculación con *Botrytis cinerea* (Figura 13). No se encontraron diferencias significativas de expansión entre el control y las plantas tratadas con etileno ( $p > 0,05$ ) habiendo tratado los datos experimentales con un test Kruskal-Wallis.



**Figura 13.** Severidad (medida como diámetro de expansión) de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* 48 h después de su inoculación en hojas de *Zinnia elegans*. Control: plantas de *Z. elegans* no tratadas; Etileno: plantas de *Z. elegans* tratadas con etileno. Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas en un test Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

### 4.2. Efecto de la BAP sobre la severidad de la enfermedad.

Se han comparado los diámetros de expansión a las 42 h tras la inoculación con *Botrytis cinerea*. Los resultados indican que la severidad de la infección es significativamente menor en las plantas de zinnia tratadas previamente con BAP (Figura 14), habiéndolo probado con un test Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14.** Severidad (medida como diámetro de expansión) de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* 42 h después de su inoculación en hojas de *Zinnia elegans*. Control: plantas de *Z. elegans* no tratadas; BAP: plantas de *Z. elegans* tratadas con BAP (6-bencilaminopurina). Las letras diferentes indican diferencias significativas en un test Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Efecto de la BAP sobre marcadores bioquímicos y moleculares de la resistencia.

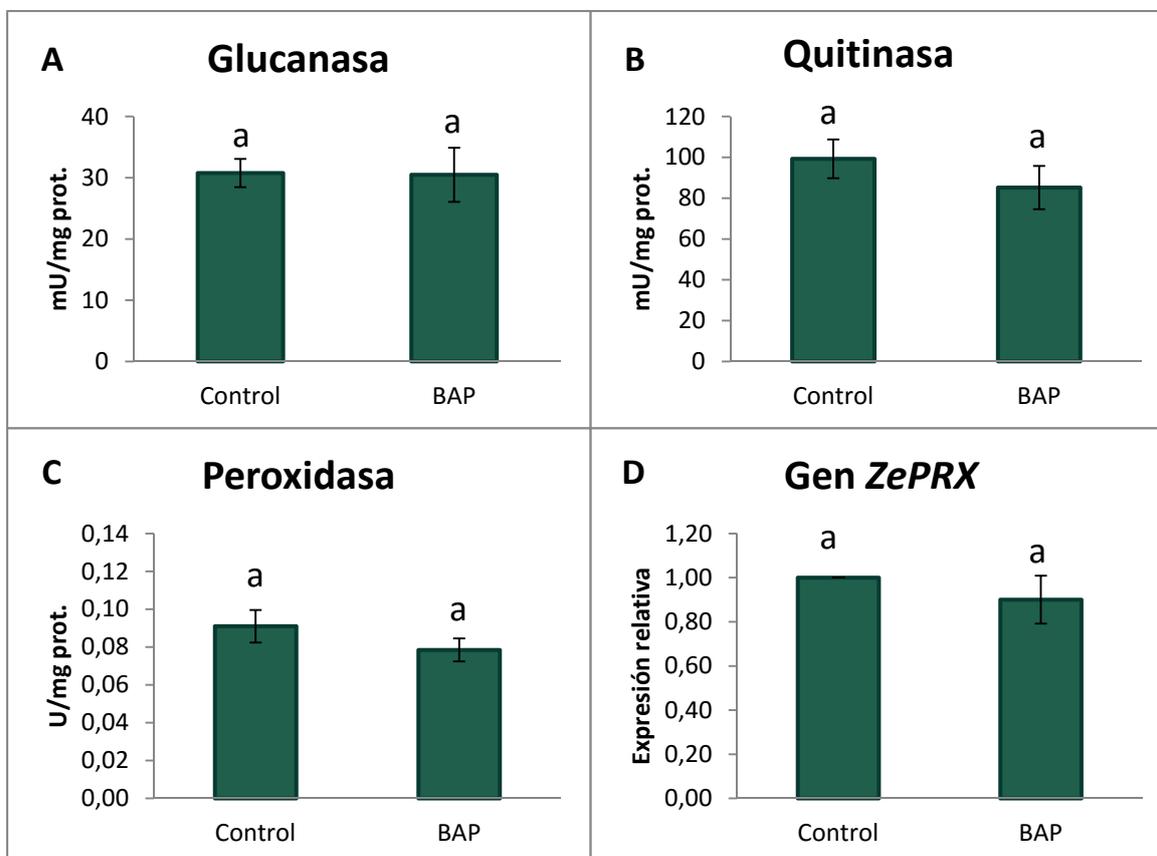
Tras comprobar que la aplicación exógena de etileno no indujo ningún aumento en la resistencia de las plantas y que la BAP sí tuvo esa capacidad, realizamos un estudio de los marcadores de defensa tan sólo con los tratamientos de los bioensayos de BAP.

Para estudiar los cambios en la fisiología de las plantas en las diferentes condiciones a las que las hemos expuesto, se llevaron a cabo varias determinaciones bioquímicas y moleculares que daban una idea de si las mismas estaban experimentando cambios a nivel fisiológico que aumentarían su resistencia ante *Botrytis* y explicarían así el menor diámetro de la lesión encontrada en las plantas tratadas con BAP como un fenómeno de inducción de resistencia. Los marcadores medidos fueron: actividad enzimática  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa y peroxidasa, y la expresión del gen *ZePRX*.

#### 4.3.1. Ensayos anteriores a la inoculación con *B. cinerea*.

Pasadas 24 h tras la aplicación de BAP en zinnia, se observó que las actividades de las tres enzimas estudiadas fueron similares en las plantas tratadas con BAP que en las

plantas no tratadas ( $p > 0,05$ ) (Figura 15 ABC). Se observó lo mismo en la expresión del gen *ZePRX*, que fue similar en plantas tratadas con BAP que en las que no lo fueron ( $p > 0,05$ ) (Figura 15D).

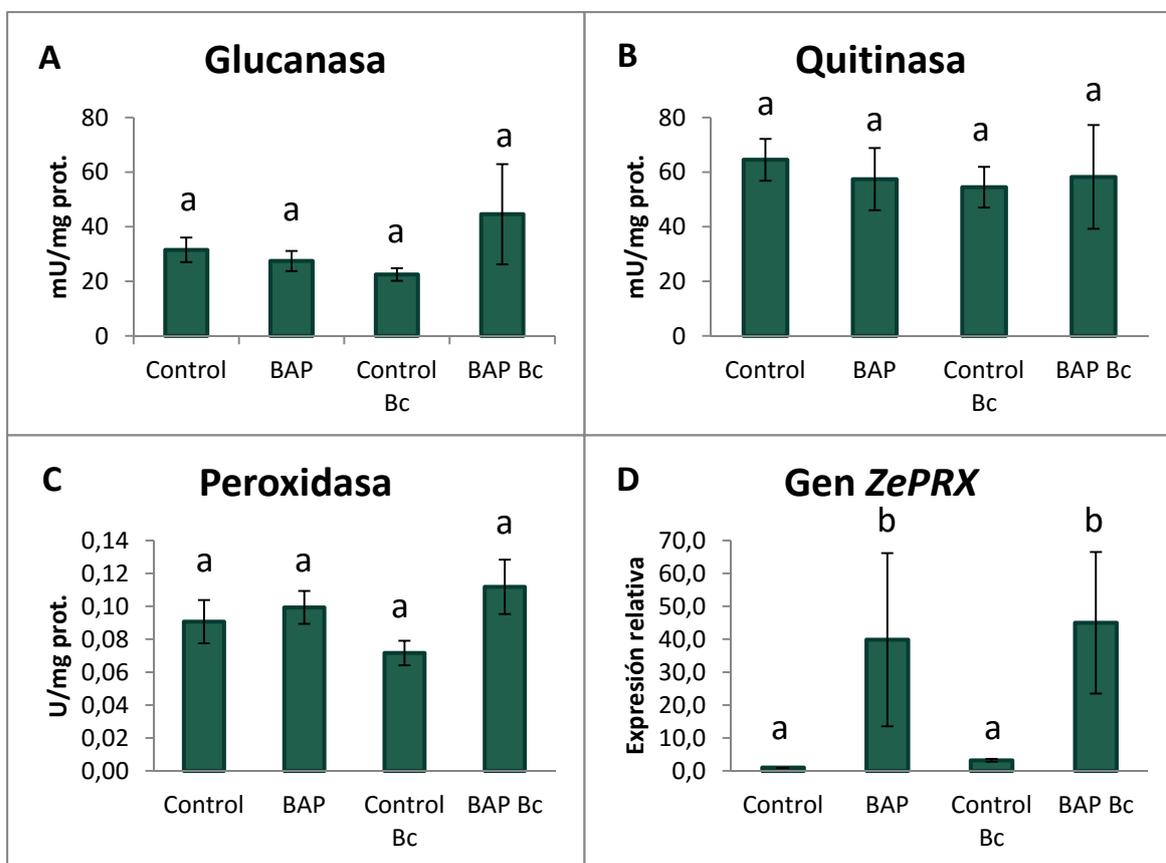


**Figura 15.** Efecto de la BAP sobre marcadores de resistencia en hojas de *Z. elegans* 24 h después de la aplicación de la hormona: A) actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa; B) actividad quitinasa; C) actividad peroxidasa y D) expresión del gen de peroxidasa implicado en lignificación (*ZePRX*). Control: hojas no tratadas; BAP: hojas tratadas con BAP. Las letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas en test estadísticos Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3.2. Ensayos posteriores a la inoculación con *B. cinerea*.

En los ensayos realizados 18 horas tras la inoculación con el patógeno (42 h después de la aplicación de BAP), los resultados de las actividades enzimáticas fueron similares a los observados a las 24 horas de la aplicación de BAP, es decir, los niveles de actividad de las tres enzimas fueron similares entre cada uno de los tres tratamientos (BAP sin inocular, control inoculado con *Botrytis* y BAP inoculado con *Botrytis*) frente al control (Figura 16 ABC).

En cambio, en el estudio de la expresión del gen de la enzima peroxidasa implicada en lignificación, se observó un aumento de expresión en los grupos tratados con BAP en comparación con los demás ( $p < 0,05$ ) (Figura 16D).



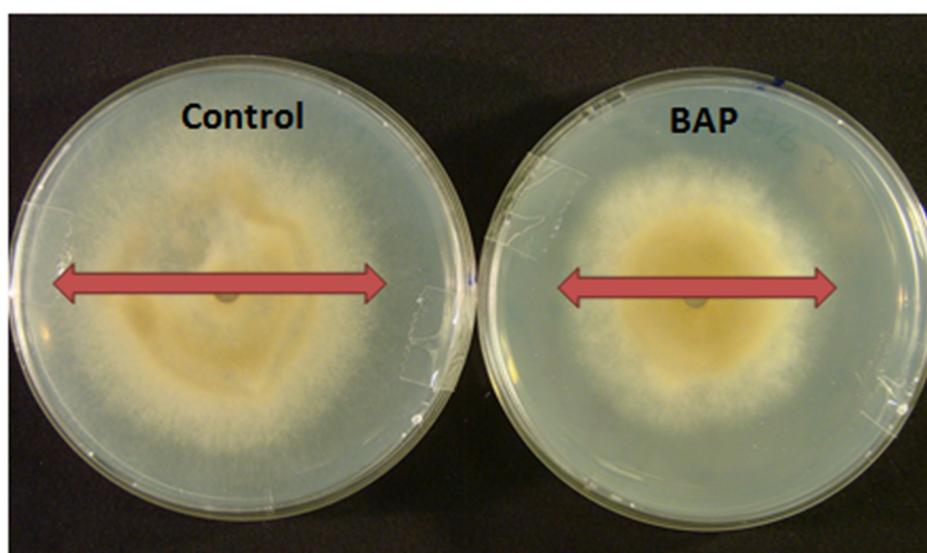
**Figura 16.** Efecto de la BAP sobre marcadores de resistencia en hojas de *Z. elegans* 42 h después de la aplicación de la hormona y 18 h tras la inoculación con *B. cinerea*: A) actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa; B) actividad quitinasa; C) actividad peroxidasa y D) expresión del gen de peroxidasa implicado en lignificación (*ZePRX*). Control: hojas no tratadas; BAP: hojas tratadas con BAP; Control Bc: hojas no tratadas con BAP e inoculadas con *B. cinerea*; BAP Bc: hojas tratadas con BAP e inoculadas con *B. cinerea*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con BAP y los demás en una ANOVA de dos vías ( $p < 0,05$ ).

Las diferencias encontradas en la severidad por el tratamiento con BAP de las plantas de *Z. elegans* frente a las plantas no tratadas y la ausencia general de diferencias observadas en algunos de los mecanismos fisiológicos de defensa (actividades enzimáticas de varias proteínas PR y expresión del gen *ZePRX*) en zinnia, nos llevaron a plantear una nueva hipótesis de un posible efecto fungicida de la BAP.

#### 4.4. Efecto fungicida de la BAP. Crecimiento en placa de *B. cinerea*.

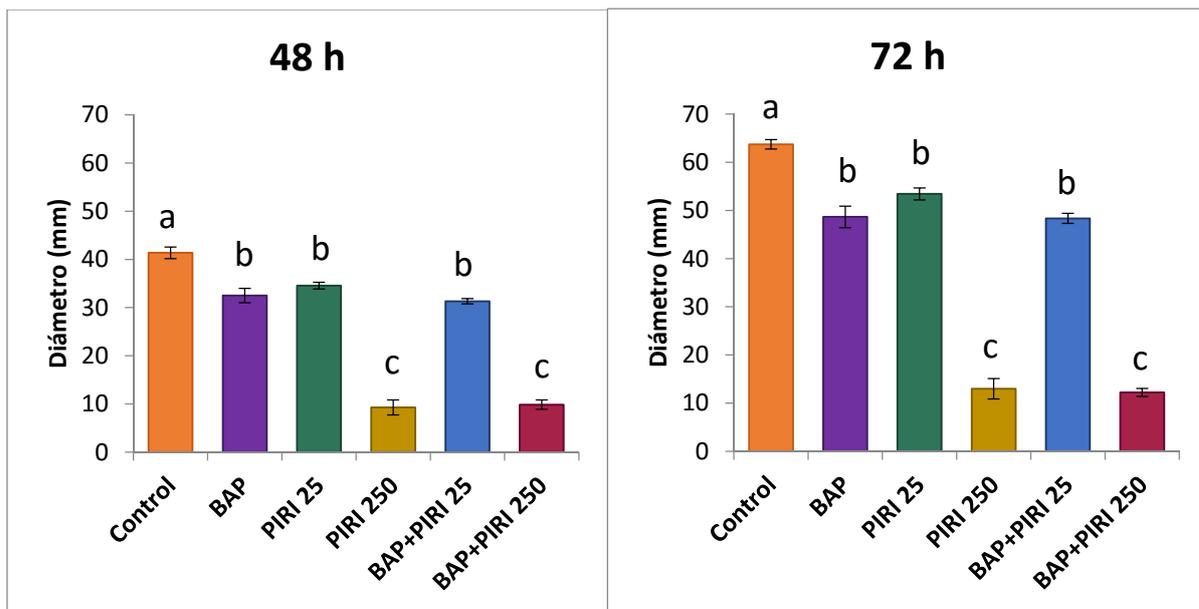
Tanto a las 48 como a las 72 h desde la siembra con *Botrytis*, los resultados fueron los mismos, pero las diferencias fueron más acusadas a las 72 h (Figura 17). Los datos obtenidos en los experimentos en placa se analizaron con una ANOVA y un test de Duncan.

En las placas a las que se les añadió BAP 50  $\mu\text{M}$ , el crecimiento del micelio de *B. cinerea* fue menor que respecto al control (Figura 18). Lo mismo se observó en las placas con el fungicida comercial SCALA a una concentración de PIRI de 25  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, se observó un menor crecimiento de *B. cinerea* en las placas que contenían el fungicida PIRI a concentración 250  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). Como se puede ver en la gráfica resumen de este experimento (Figura 18), la inhibición del crecimiento en las placas con PIRI 250  $\mu\text{M}$  es significativamente mayor que en las que tienen BAP y/o PIRI 25  $\mu\text{M}$ .



**Figura 17.** Crecimiento de *B. cinerea* en placa Petri con medio PDA. Izquierda: control; derecha: medio con BAP 50  $\mu\text{M}$ .

La mezcla de BAP y PIRI 25  $\mu\text{M}$  inhibió el crecimiento de *B. cinerea* de forma similar a la inhibición que provocó la BAP ( $p > 0,05$ ). El mismo resultado se observó en las placas con BAP y PIRI 250  $\mu\text{M}$ , en las que el crecimiento de *Botrytis* fue similar al que se dio en las placas con PIRI 250  $\mu\text{M}$  ( $p > 0,05$ ). Por tanto no se observó un efecto aditivo de PIRI y BAP.



**Figura 18.** Crecimiento (diámetro de expansión en mm) de *Botrytis cinerea* en placas con medio PDA a las 48 y 72 horas tras la inoculación con el hongo. Control: placas con DMSO; BAP: placas con BAP 50  $\mu$ M; PIRI 25: placas con el fungicida comercial SCALA a una concentración de pirimetanil de 25  $\mu$ M; PIRI 250: placas con el fungicida comercial SCALA a una concentración de pirimetanil de 250  $\mu$ M; BAP+PIRI 25: placas con el fungicida comercial SCALA a una concentración de pirimetanil de 25  $\mu$ M y BAP 50  $\mu$ M; BAP+PIRI 250: placas con el fungicida comercial SCALA a una concentración de pirimetanil de 250  $\mu$ M y BAP 50  $\mu$ M. Letras diferentes indican diferencias significativas en una ANOVA y un test de Duncan.

## 5. DISCUSIÓN.

El genoma de la cepa de *Botrytis cinerea* con la que hicimos este trabajo (B0510) está actualmente secuenciado (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/botrytis-cinerea-genome-project>). Ello supone que existe una base que permite abrir un nuevo campo de investigación molecular que proporcione una visión más clara del mecanismo de infección del hongo. Con esta base se podrían diseñar nuevas estrategias de control más exitosas y menos perjudiciales que las que existen actualmente en el mercado contra *Botrytis cinerea*.

Hoy en día existen dos principales líneas de investigación: la obtención de plantas resistentes al patógeno y el diseño de nuevos fungicidas. Todo esto se estudia intentando no comprometer la resistencia frente a biotrofos (Williamson *et al.*, 2007).

En este trabajo, el etileno aplicado antes de la inoculación del hongo no ha tenido un efecto significativo sobre la enfermedad en las condiciones experimentales utilizadas. Esto significa que el etileno no protege a *Zinnia elegans* contra la infección causada por *Botrytis cinerea*. En la introducción se citaron varios trabajos en los que el etileno promovía la defensa de la planta (Thomma *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2002; Belhadj *et al.*, 2008), pero hay también varias investigaciones que no encontraron ningún efecto del etileno o un efecto negativo (Lund *et al.*, 1998; Sharon *et al.*, 2004; Cantu *et al.*, 2009).

Se sabe que el etileno puede acelerar la senescencia en hojas y la maduración en frutos, lo que podría predisponer al tejido para el desarrollo de patógenos necrotrofos. Por otra parte, esta hormona también estimula el desarrollo de la necrosis y en muchos casos la respuesta hipersensible (Ohtsubo *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2002), procesos que facilitan la colonización de *B. cinerea* (Govrin & Levine, 2000). De hecho, se observó que *B. cinerea* induce senescencia en los tejidos diana como parte de su modo de acción (Swartzberg *et al.*, 2008). Este efecto dual del etileno (inductor de resistencia y promotor de la enfermedad) podría explicar la ausencia de diferencias encontradas en la severidad de la enfermedad causada por *B. cinerea* en plantas tratadas con etileno frente a las que no lo fueron.

En los ensayos con 6-bencilaminopurina, las plantas tratadas con la hormona mostraron menor severidad, lo que demuestra que la hormona tiene la capacidad de conferir

protección a *Zinnia elegans* frente a la infección por *Botrytis cinerea*. Este resultado concuerda con los encontrados en investigaciones de otros patosistemas, en los que se demostró que las citoquininas promueven la resistencia de las plantas (Moore & Leach, 1968; Choi *et al.*, 2010, Großkinsky *et al.*, 2011; Nafisi *et al.*, 2015).

En los ensayos del efecto de la BAP sobre varios marcadores bioquímicos y moleculares de la resistencia de la planta no se obtuvieron los resultados esperados a priori.

En el caso de la actividad de la  $\beta$ -1,3 glucanasa, no se observaron diferencias entre las plantas tratadas con BAP y las plantas control, a ninguno de los dos tiempos analizados. Estos resultados muestran que la BAP no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la enzima. Se sabe que la  $\beta$ -1,3 glucanasa es una proteína PR que hidroliza los  $\beta$ -1,3 glucanos, constituyentes importantes de las paredes celulares de los hongos. Por ello, el resultado esperado sería que la actividad de la enzima fuera mayor en las condiciones de estudio (Arshad & Frankenberger, 2002).

Los resultados son diferentes a los obtenidos por otros investigadores, que observaron incrementos en la actividad de la  $\beta$ -1,3 glucanasa en situaciones de patogénesis (Jongedijk *et al.*, 1995; Jijakli & Lepoivre, 1998). Sin embargo, Mishra y colaboradores observaron que a pesar de que la aplicación de bajas concentraciones de BAP (1 y 10  $\mu$ M) provoca un aumento en la actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa, la aplicación de altas concentraciones (100 y 200  $\mu$ M) disminuye la actividad de esta enzima (Mishra *et al.*, 2008). Como en este trabajo se ha utilizado una concentración intermedia a las citadas (50  $\mu$ M), ello explicaría que la BAP no haya provocado ni un incremento ni una disminución en los niveles de actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa.

Lo mismos resultados se dieron en la actividad quitinasa. La 6-bencilaminopurina no provocó un incremento en los niveles de esta enzima. Anteriormente se ha descrito un aumento en esta actividad al entrar la planta en contacto con un patógeno o recibir una señal que estimule la activación de los mecanismos de defensa (Barwe *et al.*, 2001).

Tampoco se observó un aumento en la actividad de la enzima peroxidasa en los tratamientos con BAP. En cambio, al estudiar la actividad del gen de la peroxidasa implicada en lignificación (*ZePRX*) se vio que pasadas 42 horas tras la inducción con la hormona, la expresión de este gen fue significativamente mayor que en el control. Este resultado indica que la 6-bencilaminopurina estimula la producción de la enzima. De

hecho, otros autores han observado que la BAP es capaz de inducir la actividad peroxidasa en melocotón (Zhang *et al.*, 2015).

Como se sabe, un gen primero se transcribe y finalmente se traduce. Una hipótesis que puede explicar los resultados obtenidos es que al tiempo analizado (42 horas tras aplicación de BAP) aún no se haya producido la traducción de la proteína ZePRX, pero sí la transcripción del gen que la codifica. En las otras proteínas PR estudiadas ( $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasa) podría haberse dado el mismo caso, lo que explicaría la ausencia de diferencias en los niveles de actividad.

Visto lo anterior, una posible explicación a los resultados alcanzados en los ensayos de efecto de la BAP en los marcadores moleculares de defensa estudiados podría ser: la BAP provoca una señalización en la planta que culmina, pasadas entre 24 y 48 h de la aplicación, con el aumento de los niveles de expresión de genes relacionados con la defensa como el *ZePRX* o los genes que codifican para quitinasas y  $\beta$ -1,3 glucanasas. Este proceso finalizaría más tarde con la biosíntesis de las proteínas y el consiguiente aumento en la actividad enzimática correspondiente. Una forma de contrastar esta hipótesis sería realizando los ensayos de medida de actividades enzimáticas a distintos tiempos; por ejemplo, a las 48, 72 y 96 horas tras la aplicación de BAP.

Que la BAP fuera capaz de inducir resistencia en la planta sería interesante en el sentido de que la resistencia inducida ofrece protección a largo plazo (Walters *et al.*, 2005). A pesar de ello, como se dijo en la introducción, la resistencia inducida nunca es completa, es decir, nunca ofrece una protección total a la planta (normalmente ofrece un control de la enfermedad de entre 20 y 85%), con lo cual en la práctica debe ser siempre utilizada junto con otras medidas de control, como los fungicidas (Walters *et al.*, 2005; Trigiano *et al.*, 2008).

En este trabajo también se ha constatado un efecto fungicida de la BAP sobre *Botrytis cinerea*, ya que el crecimiento del micelio en placa fue menor en presencia de la hormona que en condiciones normales. Por ello, se puede creer que parte de la protección o la protección total observada que ofreció la BAP a las plantas de zinnia puede deberse a este efecto fungicida. Además, en anteriores estudios se había observado que la BAP inhibe el crecimiento de otros hongos como *Phytophthora colocasiae* o *Monilinia fruticola* (Mishra *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015), pero nunca se había probado su actuación sobre *Botrytis cinerea*.

El uso de BAP como producto fitosanitario en agricultura con función de protección frente a *Botrytis cinerea* sería de alto interés por varios motivos que se explican a continuación.

Como se expuso en la introducción de este trabajo, la 6-bencilaminopurina es una hormona natural. En la actualidad esto se considera de interés para la agricultura, ya que desde hace años se viene intentando lograr una sustitución de los agroquímicos tradicionales por sustancias naturales, menos perjudiciales tanto para la salud animal y humana como para el medioambiente. Por ello, una hormona natural como la 6-bencilaminopurina sería mejor valorada como producto fitosanitario que si la misma se sintetizara artificialmente.

Además, se ha visto que la BAP a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  y el fungicida comercial pirimetanil a la mitad de concentración (25  $\mu\text{M}$ ), tienen un efecto inhibitor similar sobre el crecimiento de *B. cinerea*, lo que significa que más o menos se necesita la misma cantidad para proteger los cultivos de esta especie de hongo. Por otra parte, la inhibición del crecimiento fue mucho mayor con una concentración diez veces mayor de pirimetanil. Sería interesante realizar estudios con diferentes concentraciones de BAP para ver su efecto inhibitor.

Aun así, se debe tener en cuenta que la BAP, al ser una hormona vegetal, regula muchos procesos de desarrollo en la planta. Por lo tanto, si se aplican altas concentraciones de la misma, seguramente se alterarían los procesos que regula (división y diferenciación celular, dominancia apical, nodulación, etc.), pudiendo dar lugar a plantas protegidas frente a *Botrytis cinerea* pero deformes o con alguna característica indeseable. Sería interesante realizar estudios de optimización de la actuación de la BAP como fungicida sin comprometer los procesos naturales de la planta.

En estos ensayos de efecto de la BAP como fungicida, se ha visto también que la aplicación del mismo junto al pirimetanil no supone un efecto aditivo, es decir, el efecto de ambas sustancias no es sumatorio. De serlo, los ensayos resultarían en una mayor inhibición del moho gris cuando se utilizaron juntos. Una hipótesis que nos hemos planteado y que podría dar respuesta a este hecho sería que la diana de actuación frente al hongo fuese la misma en ambas sustancias. Se ha observado que la adición de metionina al medio en el que crece *Botrytis cinerea* supone que la inhibición del crecimiento provocada por el pirimetanil sea menor, de lo que se deduce que su

mecanismo de acción puede ser la inhibición de la síntesis de este aminoácido (Masner *et al.*, 1994).

Por los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Máster, queda abierta una puerta para profundizar en la investigación de la BAP con función de protección, que podría quizás finalizar con la aprobación y comercialización de esta hormona como producto fitosanitario. Pero todo esto es un proceso complicado y a largo plazo.

La Unión Europea posee uno de los sistemas de regulación de productos fitosanitarios más desarrollados del mundo. La autorización y comercialización de productos fitosanitarios en agricultura en la Unión Europea está actualmente muy controlada para asegurar y garantizar la protección de la salud humana y de animales y proteger el medio ambiente. Viene regulada por el Reglamento (CE) N° 1107/2009 de la Comunidad Europea. Esta normativa pretende asegurar, además, la utilización correcta, segura y eficaz de los productos fitosanitarios.

La producción agrícola en España goza de gran importancia a nivel mundial (ocupa los primeros puestos en producción de diversos cultivos); por ello, es fundamental salvaguardar nuestra competitividad a la vez que se garantiza la seguridad humana, animal y ambiental. Por ello, el Reglamento (CE) N° 1107/2009 recoge que se debe fomentar la comercialización de productos fitosanitarios de bajo riesgo mediante la oferta de incentivos (Fernández-Getino *et al.*, 2015).

Desde el año 2011, la 6-bencilaminopurina está registrada y aprobada en la Unión Europea como producto fitosanitario para dos funciones: como anti-estrés en maíz y para realizar aclareo en manzano (EU Pesticides Database, 2016). Por tanto, no sería descabellada la idea de registrar la BAP como fungicida frente a *Botrytis cinerea*. Si además se demostrara un efecto inductor de resistencia, ello apoyaría su aplicación práctica como fitosanitario.

## 6. CONCLUSIONES.

1. Se ha comprobado que la aplicación del etileno no es capaz de proteger a *Zinnia elegans* frente a la infección por *Botrytis cinerea*. En cambio, se ha observado que la aplicación de una citoquinina (6-bencilaminopurina) sí es capaz de proteger a *Z. elegans* contra el ataque de este hongo.
2. La aplicación de 6-bencilaminopurina (BAP) no induce cambios en los niveles de varias proteínas relacionadas con la defensa de la planta (proteínas PR: peroxidasa,  $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasa), ni antes ni posteriormente a la inoculación con *B. cinerea*. En cambio, se ha visto que los niveles de expresión del gen que codifica para la enzima peroxidasa implicada en la lignificación (*ZePRX*) son significativamente mayores en los tratamientos de aplicación de BAP en zinnia.
3. Se ha observado un efecto fungicida de la BAP sobre *Botrytis cinerea*, lo que podría explicar la protección observada en los bioensayos con zinnia. También se ha concluido que el efecto de la BAP no es aditivo al de un fungicida comercial (pirimetanil).

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- Acosta, M., Agulló, M.A., Cenis, J.L. & Fuchs, P. (2011). Los fitorreguladores en la agricultura. Fundamentos biológicos, tecnología de uso y normativa. Recuperada el 27 de enero de 2016 de [http://www.um.es/prinum/uploaded/files/noticias/RESUMEN\\_INFORMATIVO\\_FITORREGU\\_LADORES.pdf](http://www.um.es/prinum/uploaded/files/noticias/RESUMEN_INFORMATIVO_FITORREGU_LADORES.pdf)
- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. San Diego, California: Elsevier Academic Press.
- Álvarez, T.B. (2012). Biocontrol de *Botrytis cinerea* a partir de extractos fenólicos de fresa. Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional. Michoacán, México.
- Arshad, M. & Frankenberger, W.T. (2002). Ethylene. Agricultural sources and Applications. New York, Estados Unidos: Kuwer Academic/Plenum Publishers.
- Barna, B., Smigocki, A.C. & Baker, J.C. (2008). Transgenic production of cytokinin suppresses bacterially induced hypersensitive response symptoms and increases antioxidative enzyme levels in *Nicotiana* spp. *Biochem. Cell Biol.* **98**: 1242-1247.
- Barwe, S.P., Sathiyabama, M. & Jayabaskaran, C. (2001). Induction of chitinase activity by exogenous cytokinins in excised darkgrown cucumber cotyledons: involvement of Ca<sup>2+</sup> and staurosporinesensitive protein kinase(s) in cytokinin signaling. *J. Plant Physiol.* **158**: 1-7.
- Belhadj, A., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.F. & Mérillon, J.M. (2008). Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 5781-5787.
- Broekgaarden, C., Caarls, L., Vos, I., Pieterse, C. & Van Wees, S. (2015). Ethylene: traffic controller on hormonal crossroads to defense. *Plant Physiol.* **169**: 2371-2379.
- Buchanan, B.B., Gruissen, W. & Jones R.L. (2015). Biosynthesis of plant hormones. En: Bishop, G., Sakakibara, H., Seo, M. & Yamaguchi, S. Biochemistry and molecular biology of plants. 2<sup>a</sup> ed. Clichester, West Sussex, UK. pp 769-833.
- Cantu, D., Blanco-Ulate, B., Yang, L., Labavitch, J.M., Bennett, A.B. & Powell, A.L.T. (2009). Ripening-regulated susceptibility of tomato fruit to *Botrytis cinerea* requires NOR but not RIN or ethylene. *Plant Physiol.* **150**: 1434-1449.
- Choi, J., Huh, S.U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K.H. & Hwang, I. (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* **19**: 284-295.
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D. & Molina, A. (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front. Plant Sci.* **4**: 1-12.
- Díaz, J., ten Have, A. & van Kan, A.L. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **129**: 1341-1351.
- El Oirdi, M., El Rahman, T. A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M.C., Daayf, F., Vojnov, A. & Bouarab, K. (2011). *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell* **23**: 2405-2421.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. & Delen, N. (2004). Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems-an introduction. En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. & Delen, N. (2004). Botrytis: Biology, Pathology and Control. Dordrecht, Países Bajos: Kluwer Academic Publishers pp: 1-8.
- EU Pesticides database (2016). Recuperado el 25 de enero de 2016 de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=ES>
- Fernández-Getino, A.P., Villaverde, J.J. & Alonso-Prados, J.L. (2015). Marco legislativo para los productos fitosanitarios y sustancias activas de bajo riesgo y sustancias básicas: Artículos 22 y 23 del Reglamento (CE) N° 1107/2009. *Phytoma* **273**: 60-64.
- Flors, V. (2000). Alteración de rutas metabólicas y promoción de defensas endógenas en *Lycopersicon esculentum* Mill. Y *Capsicum annuum* L. inducidas por la aplicación de nuevos reguladores de crecimiento. Tesis doctoral. Universidad Jaume I, Castellón.
- Gómez-Ros, L. V., Gabaldón, C., López Núñez-Flores, M. J., Gutiérrez, J., Herrero, J., Miguel Zapata, J. M., Sottomayor, M., Cuello, J., Ros Barceló, A. (2012). The promoter region of the *Zinnia elegans* basic peroxidase isoenzyme gene contains cis-elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide. *Planta* **236**: 327-342.
- Govrin, E. M. & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* **10**: 751-757.

- Großkinsky, D. K., Naseem, M., Abdelmohsen, U.R., Plickert, N., Engelke, T., Griebel, T., Zeier, J., Novák, O., Strnad, M., Pfeifhofer, H., van der Graaff, E., Simon, U. & Roitsch, T. (2011). Cytokinins mediate resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signaling. *Plant Physiol.* **157**: 815-830.
- Gutiérrez, J., López, M.J., Gómez-Ros, L.V., Novo, E., Carrasco, A.E., Díaz, J., Sottomayor, M., Cuello, J. & Ros, A. (2009). Hormonal regulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. *Planta* **230**: 767-778.
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *J. Chem. Biol.* **7**: 133-141.
- Hegazi, M.A. & El-Kot, G.A. (2010). Biological control of powdery mildew on Zinnia (*Zinnia elegans* L) using some biocontrol agents and plant extracts. *J. Agric. Sci.* **2**: 221-230.
- Hoagland, D.R. & Arnon D.I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* **347**: 1-32.
- Imanaka, T., Fukui, T. and Fujiwara, S. (2001). Chitinase from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Methods Enzymol.* **330**: 319-329.
- Jijakli, M.H. & Lepoivre, P. (1998). Characterization of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain k, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Biol. Control* **88**: 335-343.
- Jones, R., Ougham, H., Thomas, H. & Waaland, S. (2013). The molecular life of plants. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Jongedijk, E., Tigelaar, H., van Roekel, J.S., Bres-Vloemans, S.A., Dekker, I., van den Elzen, P.J., Cornelissen, B.J. & Melchers, L.S. (1995). Synergistic activity of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica* **85**: 173-180.
- Kasprzewska, A. (2003). Plant chitinases. Regulation and function. *Cel. Mol. Biol. Let.* **8**: 809-824.
- Kiecana, I. & Mielniczuk, E. (2010). Fungi infected the *Zinnia elegans* Jacq. Concerning susceptibility of cultivars to selected pathogens. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* **9**: 147-160.
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F., Van Loon, L.C. & Pieterse, C. (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol.* **147**: 1358-1368.
- Leubner-Metzger, G. & Meins, F. Jr. (1999). Functions and regulation of plant  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2). En: Datta, S.K. & Muthukrishnan, S. (1999). Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, pp 49-76.
- Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal. Publicado en: "BOE" nº 279. En vigor desde 21/11/2002. Ref: BOE-A-2002-22649.
- López-Serrano, M., Fernández, M., Pomar, F., Pedreño, M.A. & Barceló, A.R. (2004). *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. *J. Exp. Bot.* **55**: 423-431.
- Lucas, J.A. (1998). Plant pathology and plant pathogens. 3<sup>a</sup> ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Lund, S.T., Stall, R.E. & Klee, H.J. (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* **10**: 371-382.
- Masner, P., Muster, P. & Schmid, J. (1994). Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides. *Pestic. Sci.* **42**: 163-166.
- Mishra, A.K., Sharma, K. & Misra, R.S. (2008). Effect of benzylaminopurine on the pathogen growth and disease development of taro leaf blight caused by *Phytophthora colocasiae*. *J. Plant Pathol.* **90**: 191-196.
- Mishra, A.K., Sharma, K. & Misra, R.S. (2012). Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *J. Plant Interact.* **7**: 95-120.
- Moore, K.G. & Leach, R. (1968). The effect of 6-benzylaminopurine (benzyladenine) on senescence and chocolate spot (*Botrytis fabae*) of winter beans (*Vicia faba*). *Ann. Appl. Biol.* **61**: 65-76.
- Moura, J.C., Valencise, C.A., Fernandes, J., Dornelas, M. & Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 360-376.
- Nafisi, M., Fimognari, L. & Sakuragi, Y. (2015). Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry* **112**: 63-71.
- Naseem, M. & Dandekar, T. (2012). The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLoS Pathog.* **8**: e1003026.

- Naseem, M., Kunz, M. & Dandekar, T. (2014). Probing the unknowns in cytokinin-mediated immune defense in *Arabidopsis* with systems biology approaches. *Bioinform. Biol. Insights* **8**: 35–44.
- Naseem, M., Kaldorf, M. & Dandekar, T. (2015). The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *J. Exp. Bot.* **66**: 4885–4896.
- NCBI. PubChem. Recuperado el 27 de enero de 2015 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>
- Nuez, F., Pérez de la Vega, M. & Carrillo, J. M. (2004). Resistencia genética a patógenos vegetales. Valencia: Editorial de la UPV.
- Ohtsubo, N., Mitsuhara, I., Koga, M., Seo, S. & Ohashi, Y. (1999). Ethylene promotes the necrotic lesion formation and basic PR gene expression in TMV-infected tobacco. *Plant Cell Physiol.* **40**: 808-817.
- Oliver, R. & Ipcho, S. (2004). Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs vs. biotrophs classification of fungal pathogens. *Mol. Plant Pathol.* **5** (4): 347-352.
- Pal, K.K. & Gardener, B.M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S & Van Wees, S. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chem. Biol.* **5**: 308-316.
- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., León-Reyes, A. & Van Wees, S.C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**: 489-521.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B., Cammue, B. & De Bolle, M. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* **46**: 941–950.
- Sharon, A., Elad, Y., Barakat, R. & Tudzynski, P. (2004). Phytohormones in *Botrytis*-plant interactions. En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. & Delen, N. (2004). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, Países Bajos: Kluwer Academic Publishers pp: 163-180.
- Stoscheck, C.M. (1990). Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* **182**: 50-68.
- Swartzberg, D., Kirshner, B., Rav-David, D., Elad, Y. & Granot, D. (2008). *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the *IPT* gene. *Eur. J. Plant Pathol.* **120**: 289–297.
- Thomma, B., Eggermont, K., Tierens, K. & Broekaert, W. (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **121**: 1093–1101.
- Trigiano, R.N., Windham, M.T. & Windham, A.S. (2008). Plant pathology. Concepts and laboratory exercises. Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- Van der Ent, S., Koornneef, A., Ton, J. & Pieterse, C. (2009). Induced resistance. Orchestrating defence mechanisms through crosstalk and priming. *Annu. Plant Rev.* **34**: 334-370.
- Van der Ent, S. & Pieterse, C. (2012). Ethylene: multi-tasker in plant-attacker interactions. *Annu. Plant Rev.* **44**: 343-377.
- Van Kan, J. A. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* **11**: 247-253.
- Van Loon, L.C., Geraarts, B. & Linthorst, H. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **11**: 184-191.
- Van Loon, L.C. & Van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**: 85-97.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* **153**: 895–905.
- Vidhyasekaran, P. (2002). Plant hormone signaling systems in plant innate immunity. Dordrecht, Países Bajos: Springer.
- Walker, A.S., Micoud, A., Rémuson, F., Grosman, J., Gredt, M. & Leroux, P. (2013). French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Manag. Sci.* **69**: 667-678.
- Walters, D., Walsh, D., Newton, A. & Lyon, G. (2005). Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology* **95**: 1368-1373.
- Walters, D., Ratsep, J. & Havis, N. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J. Exp. Bot.* **64**: 1263–1280.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. & Van Kan, J. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 561-580.

- Zeller, W. (2006). Status on induced resistance against plant bacterial diseases. *Fitosanidad*, **10**: 99-103.
- Zhang, W. & Wen, C.K. (2010). Preparation of ethylene gas and comparison of ethylene responses induced by ethylene, ACC, and ethephon. *Plant Physiol. Biochem.* **48**: 45-53.
- Zhang, Y., Zeng, L., Yang, J., Zheng, X. & Yu, T. (2015). 6-Benzylaminopurine inhibits growth of *Monilinia fructicola* and induces defense-related mechanism in peach fruit. *Food Chem.* **187**: 210-217.