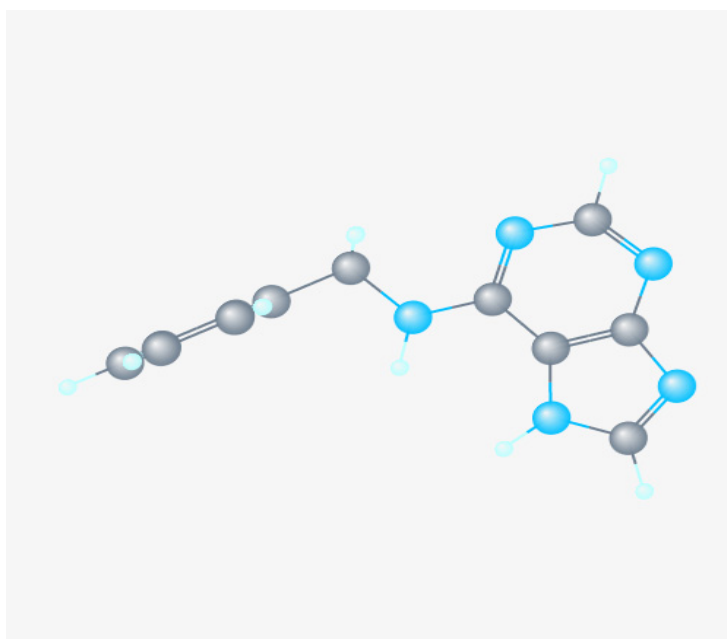




UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

REGULACIÓN DA RESISTENCIA A *PHYTOPHTHORA CAPSICI* POR
CITOCININAS EN FEIXÓN



Traballo de fin de grado

Curso 2015/2016

Grado en Bioloxía

Clara Pardiño Orol



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

D. JOSÉ DÍAZ VARELA, PROFESOR TITULAR DE FISIOLOXÍA VEXETAL, DOUTOR EN BIOLOXÍA, E D. JAVIER VELOSO FREIRE, PROFESOR CONTRATADO INTERINO DE SUBSTITUCIÓN DE FISIOLOXÍA VEXETAL, DOUTOR EN BIOLOXÍA, DO DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA ANIMAL, BIOLOXÍA VEXETAL E ECOLOXÍA DA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que o presente Traballo de Fin de Grado presentado pola alumna CLARA PARDIÑO OROL e titulado

“Regulación da resistencia a *Phytophthora capsici* por citocininas en feixón”

“Regulación de la resistencia a *Phytophthora capsici* por citoquininas en judía”

“Regulation of resistance to *Phytophthora capsici* by cytokinins in bean”

foi realizado baixo a súa dirección e autorizan a súa presentación para que poida ser xulgado polo tribunal correspondente.

E para que así conste, expiden e asinan o presente informe en A Coruña, a 5 de Febreiro de 2016.

Asdo. José Díaz Varela

Asdo. Javier Veloso Freire

Índice

	Páxina
Resumo.	1
1.Introdución.	2
1.1.As citocininas	2
1.2. <i>Phytophthora capsici</i>	3
1.3.Hóspede: <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	6
1.4.Fitohormonas e resistencia	7
2.Obxectivos	9
3.Materiais e métodos	9
3.1.Material vexetal	9
3.2.Material patóxeno	9
3.3.Método de indución	9
3.4.Método de inoculación e determinación de síntomas	9
3.5.Toma de mostrás	10
3.6.Extracción e determinación de compostos fenólicos	10
3.7.Análise estatístico	11
4.Resultados	11
4.1.Efecto da Benciladenina sobre os síntomas causados por <i>Phytophthora capsici</i> .	11
4.2.Efecto da Benciladenina sobre o contido en compostos fenólicos.	11
5.Discusión	14
6.Conclusión	15
7.Bibliografía	16

Resumo

Phytophthora capsici é un patóxeno de gran plasticidade que conta con varios hóspedes, entre os cales se atopa o feixón (*Phaseolus vulgaris*), unha planta amplamente cultivada e de grande importancia económica, polo que se fai necesario o estudo das súas enfermidades para poder facer fronte ás mesmas. Os obxectivos deste traballo son comprobar se a aplicación exóxena de bencilaminopurina nas follas da planta do feixón confire resistencia fronte a *P. capsici*, así como se este tratamento vai provocar variacións nos niveis de fenóis, un grupo de compostos relacionados coa resposta defensiva. Os datos obtidos mostraron unha diminución da área enferma nas plantas que foron inducidas con bencilaminopurina, que resultou ser máis notoria a nivel local que sistémico. Por outra banda o análise de compostos fenólicos revelou unha diminución nos mesmos nas plantas tratadas con bencilaminopurina, en comparación coas plantas non inducidas. Tomando estes datos como base, concluíuse que a bencilaminopurina vai inducir resistencia a nivel local e sistémico fronte á infección con *Phytophthora capsici*.

Resumen

Phytophthora capsici es un patógeno de gran plasticidad que cuenta con varios huéspedes, entre los cuales se encuentra la judía (*Phaseolus vulgaris*), una planta amplamente cultivada y de gran importancia económica, por lo que se hace necesario el estudio de sus enfermedades para poder hacer frente a ellas. Los objetivos de este trabajo son comprobar si la aplicación exógena de bencilaminopurina en las hojas de la planta de la judía confiere resistencia frente a *P. capsici*, así como si este tratamiento va a provocar variaciones en los niveles de fenoles, un grupo de compuestos relacionados con la respuesta defensiva. Los datos obtenidos mostraron una disminución del área enferma en las plantas que fueron inducidas con bencilaminopurina, que resultó ser más notoria a nivel local que sistémico. Por otro lado el análisis de compuestos fenólicos reveló una disminución de los mismos en las plantas tratadas con bencilaminopurina, en comparación con las plantas no inducidas. Tomando estos datos como base, se concluye que la bencilaminopurina va a inducir resistencia a nivel local y sistémico frente a la infección con *Phytophthora capsici*.

Abstract

Phytophthora capsici is a pathogen of great plasticity, with several hosts. One of the is bean, a widely grown and economically important plant. Therefore, it is necessary to study the diseases of bean to control them. The objectives of this study are to test whether exogenous application of benzylaminopurine to the leaves of bean confers resistance against to *P. capsici*, and if this treatment causes variations in the levels of phenols, a group of compounds related to defensive response. The data obtained showed a decrease in the diseased area of plants that were induced with benzylaminopurine, that was more noticeable at the local level than the systemic level. On the other hand, the analysis of phenolic compounds revealed a decrease in the plants treated with benzylaminopurine, compared to non-induced plants. Taking into account these data, it is concluded that benzylaminopurine induces local and systemic resistance against infection with *Phytophthora capsici*.

1.Introdución

1.1.As citocininas

As citocininas son fitohormonas implicadas en diversos procesos do desenvolvemento da planta (Grosskinsky *et al.* 2011). Trátase de compostos químicos que contan coa base púrica adenina, así como cun substituínte de natureza aromática ou isoprenoide, o cal se sitúa na posición 6 do anel de purina. A natureza química dos substituíntes do anel é o que nos permite clasificar as citocininas naturais en:

-Citocininas isoprenoídicas: Comprenden as familias da isopenteniladenina, a dihidrozeatina e a zeatina (Fig.1); son as máis abundantes nas plantas.

-Citocininas aromáticas: grupo integrado por aquelas citocininas que contan cun grupo aromático na súa estrutura. Un exemplo destas son: meta-Topolina (mT), orto-topolina (oT) (Fig.1), etc.

Ademáis tamén podemos diferenciar as citocininas sintéticas (Fig.1), que son aquelas hormonas que non aparecen na natureza, senón que son sintetizadas químicamente; neste grupo podemos atopar a benciladenina tamén chamada Bencilaminopurina (Fig.1) (Russell *et al.*, 2013).

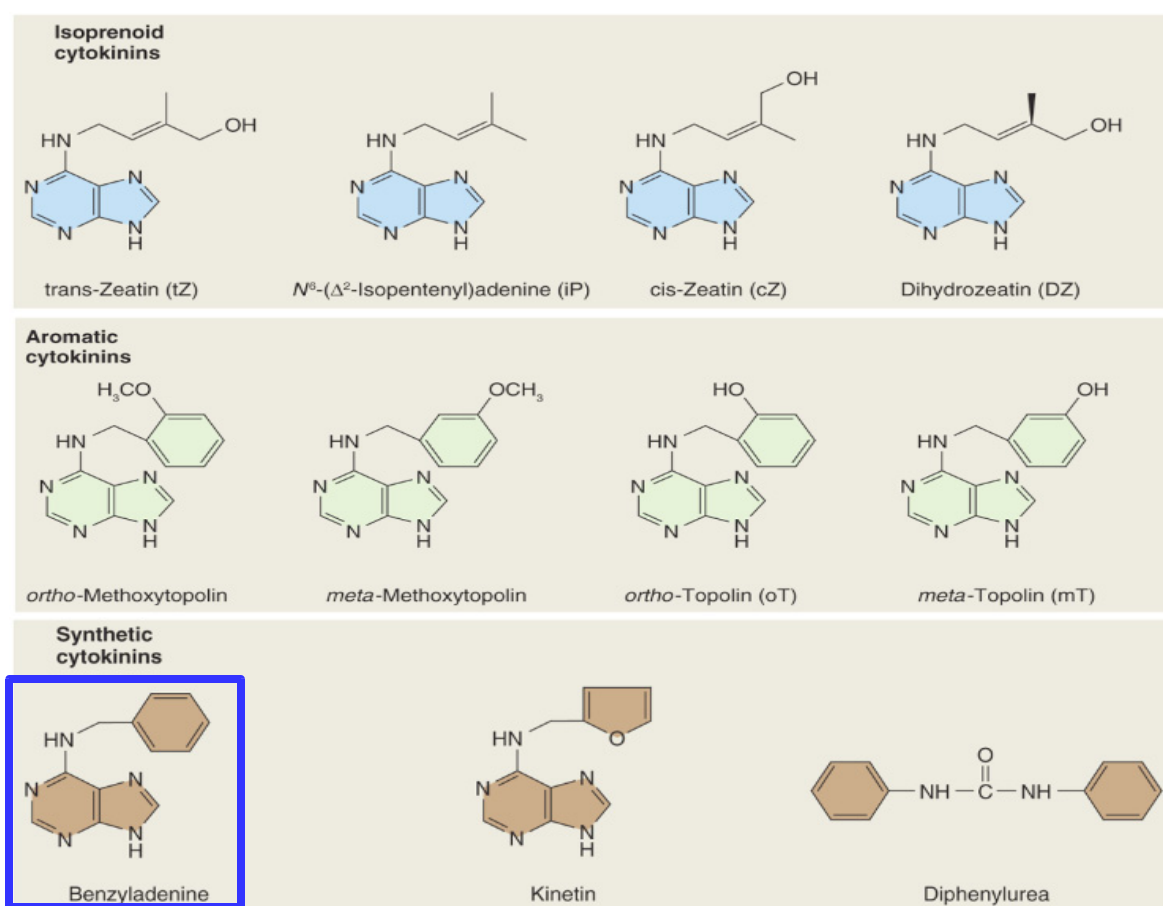


Figura 1. Estrutura e nomenclatura dalgunhas das principais citocininas isoprenoídicas (A), aromáticas (B) e tamén sintéticas (C) entre as cales se destaca a benciladenina. (Russell *et al.* 2013)

As citocininas teñen diferentes efectos fisiolóxicos na planta: estimulan a división celular, modifican a dominancia apical e estimulan o crecemento das xemas laterais. A súa proporción en canto ás auxinas controla a morfoxénese así como a formación de brotes. Por outra banda retrasan a senescencia, promoven a maduración dos cloroplastos e a expansión das follas e

dos cotiledóns; tamén estimulan a mobilización dos nutrientes a certos órganos (Azcón-Bieto *et al.*, 2008).

A concentración das hormonas vexetais debe de ser a axeitada para que a sinal que orixinan tamén o sexa. De xeito xeral, a concentración de hormona que podemos atopar nun tecido ou célula determinado, ven dado polo equilibrio entre a taxa de aumento da súa concentración (procesos de biosíntese, activación local ou importación dende outros lugares da planta) e a de diminución (comprende diferentes procesos como a inactivación, degradación ou secuestro). Pero a regulación dos niveis hormonais é moi complexa: as vías de biosíntese das hormonas primarias inflúen nas das secundarias, e pódense diferenciar múltiples variantes estruturais da hormona, así como dos mecanismos para a eliminación da mesma (Taiz *et al.*, 2015)

1.2. Phytophthora capsici

Phytophthora capsici é un organismo pertencente ao reino Protista, da clase Oomycetes, o cal conta cun amplo rango de hóspedes (Hawksworth *et al.*, 1995) (Táboa 1). Ademais, dentro do xénero *Phytophthora*, *P. capsici* pertencería ao clado 2, segundo estudos baseados en loci representativos deste xénero (Blair *et al.* 2008). Algunhas das principais diferenzas que separan a este patóxeno e outros oomicetos dos fungos verdadeiros son: as paredes dos oomicetos están compostas principalmente de α -1,3-glucano e celulosa, mentres que nos fungos verdadeiros atopamos quitina e incluso glicano; por outra banda, o ciclo vital destes últimos é fundamentalmente haploide, e nos oomicetos é diploide con zoosporas biflaxeladas. (Cavalier-Smith, 1998; García-Jiménez *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010).

Táboa 1. Clasificación dos Oomicetes. (Adaptado de Hawksworth *et al.*, 1995).

Reino Protista	Clase Oomycetes	Orde Lagenidiales	Familia	Xénero
		Leptomitales		
		Saprolegniales	Saprolegniaceae	Achlya Saprolegnia
		Peronosporales	Pythiaceae	Pythium Phytophthora
			Peronosporaceae	Bremia Peronospora
			Albuginaceae	Albugo

Como xa se menciona no parágrafo anterior, *P. capsici* conta cun gran número de hóspedes, nos cales a enfermidade pode aparecer en calquer etapa do ciclo da planta, e os síntomas van variar en función da especie do hóspede, as áreas de infección e as condicións ambientais nas que se produza; trátase así dun patóxeno moi dinámico e con alta capacidade destrutiva (Fig.2) (Baysal *et al.*, 2005; Lamour *et al.*, 2012).

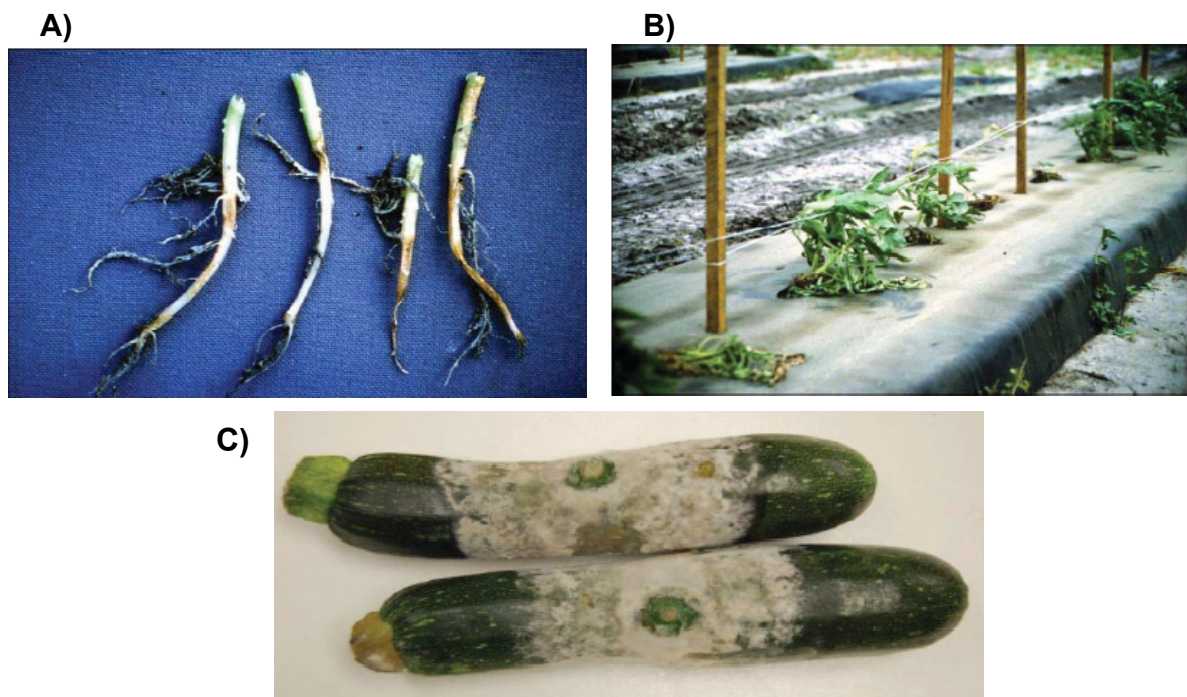


Fig.2. Mostra dos síntomas de infección por *Phytophthora capsici*. A) Lesións e podremia da raíz producida por *P. capsici* na planta do pemento. B) Tomateira murcha por mor de *Phytophthora capsici*. C) Podremia na cabaciña provocada por *P. capsici*. (Adaptado de Gevens *et al.*, 2010).

Este patóxeno presenta un ciclo de vida con fase asexual e fase sexual, esta última vai requirir de illados compatibles (A1 e A2), debido a que se trata dunha especie heterotálica. Coa entrada en contacto de micelios compatibles dáse a formación de estruturas diploides resistentes a condicións ambientais desfavorables, denominadas oosporas (Bowers *et al.*, 1990; Lamour & Hausbeck, 2003), das cales xorden tubos xerminativos que se ramifican, podendo dar lugar a un micelio típico e/ou á produción de esporanxios. Se as condicións ambientais son favorables, *P. capsici* reproducése asexualmente, xerando unha gran cantidade de esporanxios na zona de infección, dentro dos cales se forman zoosporas biflaxeladas. Estas estruturas libéranse ao medio en condicións de choiva ou regadío, desprazándose na planta por quimiotaxis. Posteriormente, prodúcese o enquistamento da zoospora, a súa adherencia á superficie vexetal así como a conseguinte formación do tubo xerminativo (Fig. 3). A adhesión ven dada por unha substancia mucosa constituída principalmente por glicoproteínas de alto peso molecular, que son acumuladas en vesículas citoplasmáticas e liberadas pola zoospora. Unha vez a estrutura está fixada, fórmase o tubo xerminativo, que vai penetrar nos tecidos do hóspede de forma directa, mediante aberturas naturais como os estomas, feridas nos tecidos ou mediante o emprego de enzimas (Li *et al.*, 2011). Os apresorios son unhas estruturas que se poden formar nalgúns casos nas zonas de infección, e que se poden definir como elementos globosos especializados para a penetración no hóspede (Lamour *et al.*, 2012).

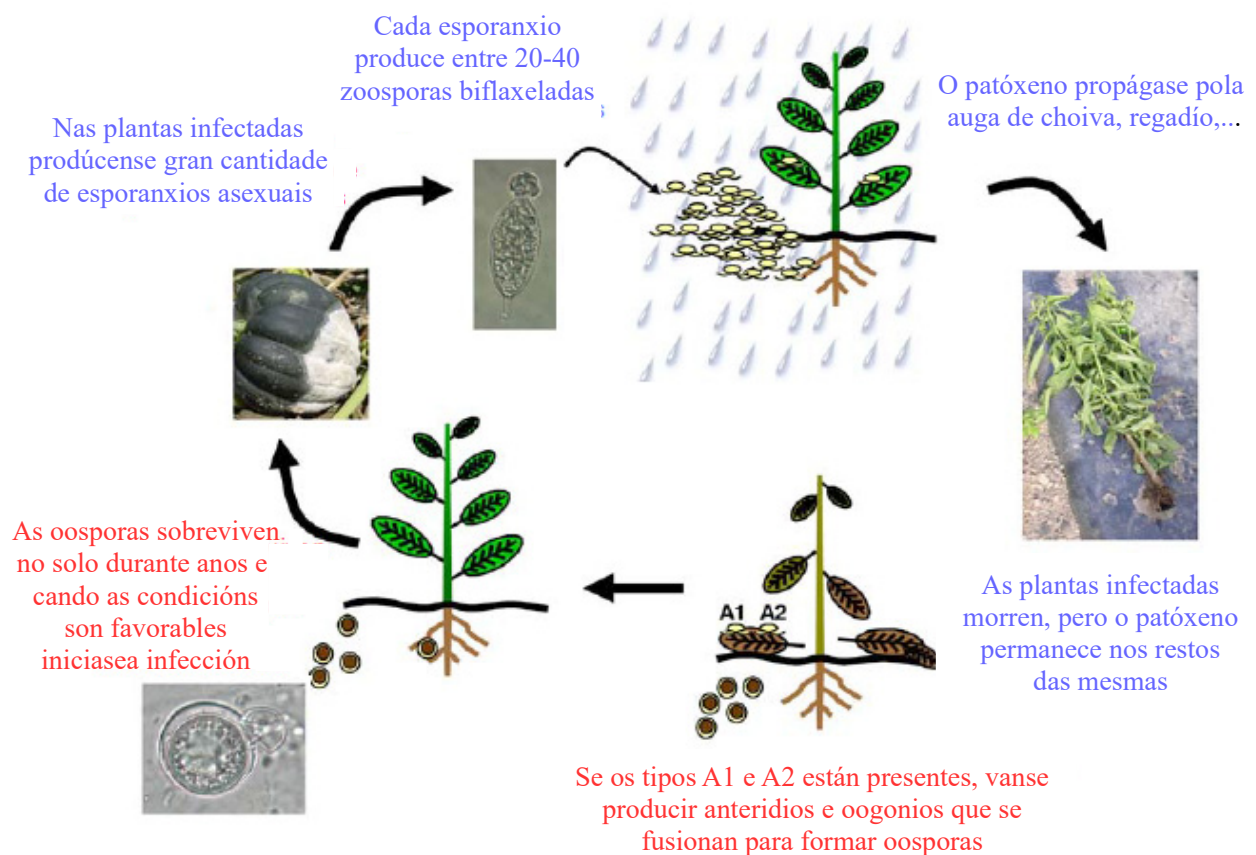


Fig.3. Ciclo de infección de *P. capsici*, as anotacións en azul refírense á fase asexual do ciclo, e as vermellas á sexual. (Adaptado de Pardo, 2013).

Segundo a estratexia de infección que siga o organismo fitopatóxeno, este pode tratarse dun biotrofo, hemibiotrofo ou necrotrofo (Fig.4). *Phytophthora capsici* é un hemibiotrofo, polo que conta cunha fase inicial biotrofa sen síntomas evidentes, na que amosan un crecemento periplásmico de hifas especializadas na célula xa invadida, a cal da paso a outra fase con comportamento necrotrofo, na cal se vai producir a necrose do tecido de forma previa a invasión. A necrotización do tecido xera o seu colapso, ao cal segue a aparición dos esporanxios, permitíndolle iniciar un novo evento de infección. Polo tanto, imos poder diferenciar unha fase inicial aparentemente asintomática (etapa biotrofa) seguida doutra na que os síntomas si son visibles (etapa necrotrofa) (Hausbeck & Lamour, 2004; Jiménez-Díaz & Zabalgoageazcoa, 2010; Lamour *et al.*, 2012).

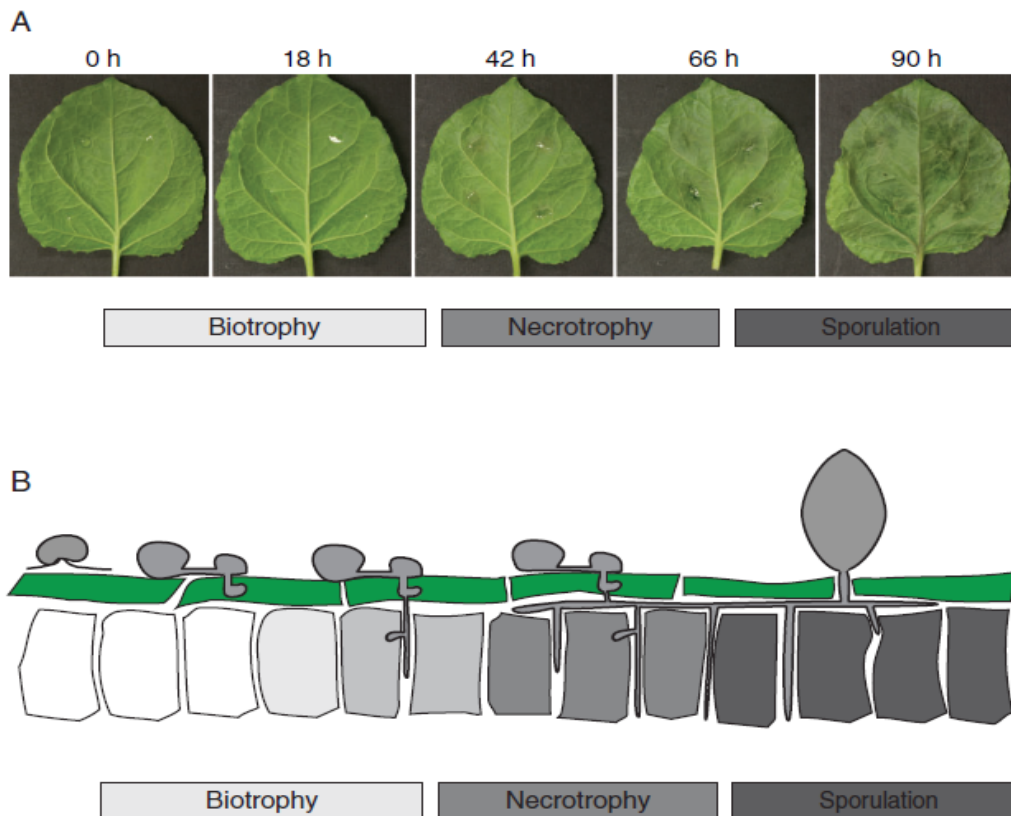


Fig.4. (A) Efectos da infección por *P.capsici* en follas de *Nicotiana benthamiana* Domin nas súas dúas fases. (B) Esquema das fases de infección de *P. capsici* .(Lamour *et al.*, 2012).

Un dos hóspedes potenciais de *P. capsici* é o feixón (*Phaseolus vulgaris* L.), leguminosa amplamente cultivada e de grande importancia económica na que o patóxeno pode afectar diferentes partes da mesma, como se mostra na figura 5 (Lois, 2015).

1.3.Hóspede: *Phaseolus vulgaris* L.

O hóspede empregado neste traballo para a experimentación co patóxeno *Phytophthora capsici* é *Phaseolus vulgaris* L., coñecido comunmente como feixón. Esta é unha planta fanerógama da familia das fabáceas, a cal é anual e cun ciclo de vida relativamente curto; ademais presenta un importante interese económico. A forma salvaxe provén de América, e actualmente está domesticada (Díaz Leal, 2012). Esta especie cultívase amplamente en España, e é unha das leguminosas de maior importancia a nivel mundial, polo que se fai necesario o desenvolvemento de métodos para o control das súas enfermidades (Santalla *et al.*, 1999; Olmedilla-Alonso *et al.*, 2013).



Fig.5: Efectos de *P. capsici* en feixón. Nas imaxes pódense observar como o patóxeno pode afectar a diferentes partes da planta, como as follas ou os froitos. (Adaptado de Lois, 2015).

1.4.Fitohormonas e resistencia

Nos últimos anos, desenvóléronse un gran número de estudos co obxectivo de empregar, con eficacia, o manexo da resistencia inducida como estratexia para o control dos axentes patóxenos das plantas. Este tipo de resistencia pode ser inducida a nivel local e sistémico, producindo un aumento na expresión dos mecanismos de defensa naturais das plantas contra un amplo rango de patóxenos (Díaz *et al.*, 2005; Walters *et al.*, 2013; Zeller, 2006). Ademais, cabe mencionar que, este tipo de resistencia pode ser inducida nas plantas por diferentes factores abióticos e bióticos, entre estes últimos podemos atopar diversas bacterias, lévedos e fungos; algúns son patóxenos de plantas e outros non (Díaz *et al.*, 2005; Walters *et al.*, 2013). As interaccións entre diversas hormonas relacionadas co estrés (ácido salicílico e ácido xasmónico/etileno), van representar o punto central que determina a inmunidade; pero serán as hormonas promotoras do crecemento, entre as cales se atopan as citocininas, as que inhiban ou potencien o equilibrio protección-susceptibilidade da planta fronte ao patóxeno (Naseem & Dandekar, 2012).

A resistencia inducida, pódese definir como a resposta a nivel sistémico que pode expresar unha planta fronte diferentes tipos de patóxenos. A resistencia sistémica adquirida (SAR) e a resistencia sistémica inducida (ISR) son dúas das respostas mellor caracterizadas (Smith *et al.* 2010). A SAR e a ISR están reguladas pola expresión do xen NPR1, punto de converxencia que relaciona as dúas rutas. Naseem & Dandekar (2012) explican a interacción anterior, así como a influencia das citocininas sobre a mesma: durante o proceso de infección vaise producir unha diminución dos niveis de citocininas. Estas últimas vanse encargar de activar a vía SAR a nivel do factor transcricional TGA3 dunha maneira dependente de NPR1. Pero as citocininas tamén inhiben o transporte de auxinas, o que provoca un desequilibrio no fluxo e distribución da fitohormona. Deste xeito, as auxinas e as citocininas presentan unha inhibición recíproca, contribuindo de xeitos diferentes aos procesos de defensa das plantas fronte aos patóxenos (Fig.6). A relación entre os niveis de citocininas e de ácido salicílico tamén foi estudada por Choi *et al.* (2011), que observaron como a aplicación exóxena de t-zeatina en *Arabidopsis* provocaba un incremento nos niveis de ácido salicílico, influindo positivamente a inmunidade que presenta a planta. Esta interacción positiva entre ácido salicílico e citocininas tamén se observou na planta do arroz, na cal se produce un aumento da resistencia ao fungo *Magnaporthe oryzae*. En *Arabidopsis*, a estabilización dos niveis de citocininas aumenta a resistencia contra o patóxeno hemibiotrofo *Verticillium longisporum*. Estes son exemplos que ilustran como o control e aumento dos niveis de citocininas permiten mellorar a inmunidade da planta ao interferir na vía da SAR (Nassem *et al.*, 2015).

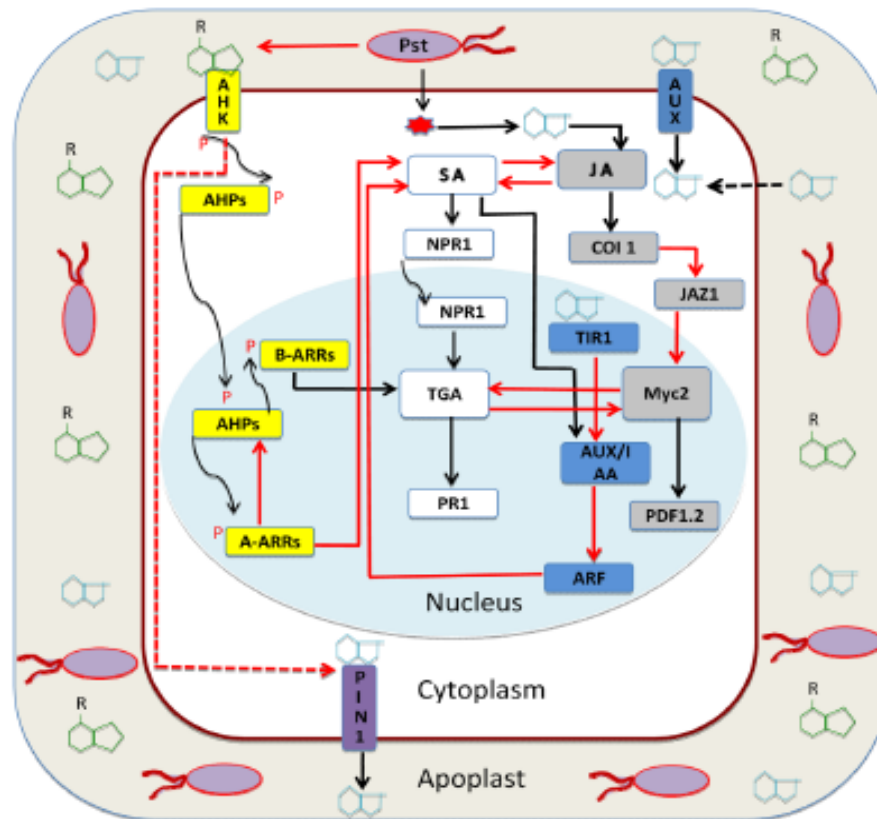


Fig.6. Influencia da interacción auxinas-citocininas na inmunidade da planta. (Tomado de Naseem & Dandekar, 2012).

Pero a influencia das citocininas na ruta da SAR tamén pode ter efectos negativos, tal e como observaron Hann *et al.* (2014) nun estudo no que a aplicación esóxena de citocininas afectou de xeito negativo á inmunidade en *Arabidopsis*, ao reprimir os receptores de recoñecemento do patóxeno.

En tabaco, Grosskinsky *et al.* (2011), observaron que a indución da biosíntese endóxena da fitohormona nas follas, aumenta a resistencia contra *Pseudomonas syringae*. Ademais, tamén demostraron que a aplicación esóxena de quinetina, xa sexa a través da súa pulverización na superficie foliar ou subministrada polo peciolo, vai diminuír o desenvolvemento de síntomas nas follas infectadas. Neste traballo viron que esta resistencia mediada polas citocininas era independente do ácido salicílico, xasmonatos e etileno, polo que se trataría dun proceso non vinculado ás rutas da SAR e da ISR. Demostrouse que as citocininas inducen resistencia na planta do tabaco, debido a que van provocar un aumento na síntese de dúas fitoalexinas con actividade antimicrobiana.

O emprego de altas concentracións de citocininas esóxenas, tamén tivo resultados positivos contra o oidio da cebada. Observouse como estas fitohormonas inducían alteracións na morfoloxía dos apresorios, sendo así capaces de evitar o desenvolvemento do patóxeno (Grosskinsky *et al.*, 2011). Un estudo sobre o tizón da folia do taro (*Colocasia esculenta* L. Schott), demostrou que a aplicación de altas concentracións de bencilaminopurina tiña un efecto funxicida a nivel local sobre o patóxeno *Phytophthora colocasiae* (Mishra *et al.*, 2008).

Tendo en conta os antecedentes, así como toda a información anterior, neste traballo realizouse a pulverización cunha solución de benciladenina, para determinar se esta confire protección fronte ao hemibiotrofo *P. capsici* na planta do feixón (*Phaseolus vulgaris* L.).

Ademais, tamén se discute a participación dos diferentes mecanismos de resistencia, comprobando a posible implicación dos fenos.

2. Obxectivos

Os obxectivos deste traballo son dous:

1. Comprobar de xeito experimental se mediante a aplicación esóxena da citocinina Benciladenina (BAP) nas follas, se consegue resistencia fronte a *P. capsici* na planta do feixón (*Phaseolus vulgaris* L.).
2. Ver se a aplicación da BAP vai orixinar variacións na planta dos niveis de fenois, compostos relacionados coa resposta defensiva.

3. Materiais e métodos

3.1. Material vexetal

Neste traballo empregamos plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. (cultivar Helda), as cales se obtiveron mediante sementeira en perlita e regado con solución nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950). O sementado mantívose durante 7 días en condicións controladas, con 16 horas de luz a 25°C e 8 horas de escuridade a 18°C. Tras os 7 días, as plántulas foron transplantadas a unha mestura de terra e perlita (3:1 v/v). Unha vez transplantadas, as plántulas mantivéronse 3 días nas condicións anteriormente expostas, para logo aplicarlles o tratamento de indución correspondente á experimentación.

3.2. Material patóxeno

O illado de *Phytophthora capsici* empregado foi o Pc450, proporcionado por Franck Panabières (UMR INRA, Francia). O cultivo desta cepa realizouse en placas con medio PDA (Agar Dextrosa Pataca), incubadas durante 7 días a temperatura ambiente. Para a inoculación das plántulas empregáronse discos do cultivo cun diámetro de 9mm.

3.3. Método de indución

Durante a experimentación distinguimos entre plantas control e inducidas, cada un destes grupos integrados por 6 plántulas. Logo do proceso de transplante, e pasados 3 días nas condicións controladas indicadas anteriormente, as plántulas foron inducidas. A indución nas plantas pertencentes ao grupo control consistiu na pulverización de 25ml dunha solución de dimetilsulfóxido (DMSO) 0,05%; mentres que no caso das inducidas a pulverización realizouse cunha disolución de benciladenina (BAP) 50µM disolta en DMSO 0,05%. En ambos casos, a indución fíxose tan só nunha das follas, para así poder analizar os resultados a nivel local (folia tratada) e sistémico (folia non tratada).

Realizáronse dous experimentos independentes, con seis plantas por experimento e tratamento para avaliar os síntomas, e tres experimentos independentes para as medidas dos fenois.

3.4. Método de inoculación e determinación de síntomas.

Transcorridas 24h logo da indución, realizouse a inoculación das plantas empregando discos cun diámetro de 9mm do cultivo de *P. capsici*. Neste proceso realizouse a colocación, de forma simétrica, de 2 discos en cada unha das follas de cada planta. As plantas incubáronse en

caixas de plástico transparentes, cunha humidade elevada para favorecer o desenvolvemento da enfermidade, os cales se mantiveron nunhas condicións de 16 horas de luz a 25°C e 8 de escuridade a 18°C; a continuación, procedeuse a realizar a medida do diámetro de infección provocada polo fitopatóxeno ás 24, 48 e 72h trala inoculación. Con esta medida, posteriormente calculouse a área enferma de cada planta a nivel local e sistémico.

3.5.Toma de mostras

O seguinte punto, consistiu noutra experimentación para comprobar se a pulverización do BAP na folla, provoca cambios nos niveis normais de compostos fenólicos.

Para a toma de mostras realizáronse 3 experimentos independentes, para os cales se seguiu a mesma metodoloxía que nos anteriores pero, pasadas 24h logo da inoculación, as follas sistémicas de cada tratamento son pesadas conxuntamente, ao igual que as locais, para posteriormente ser conxeladas a -20°C. Os tratamentos foron: plantas control non inoculadas, plantas control inoculadas, plantas inducidas con BAP non inoculadas, e plantas inducidas con BAP e inoculadas con *P. capsici*, tendo que diferenciar en cada caso entre follas sistémicas e locais (Fig.7). Deste xeito, en cada unha das mostras contabamos con tres follas coas que poder realizar a determinación dos compostos fenólicos.

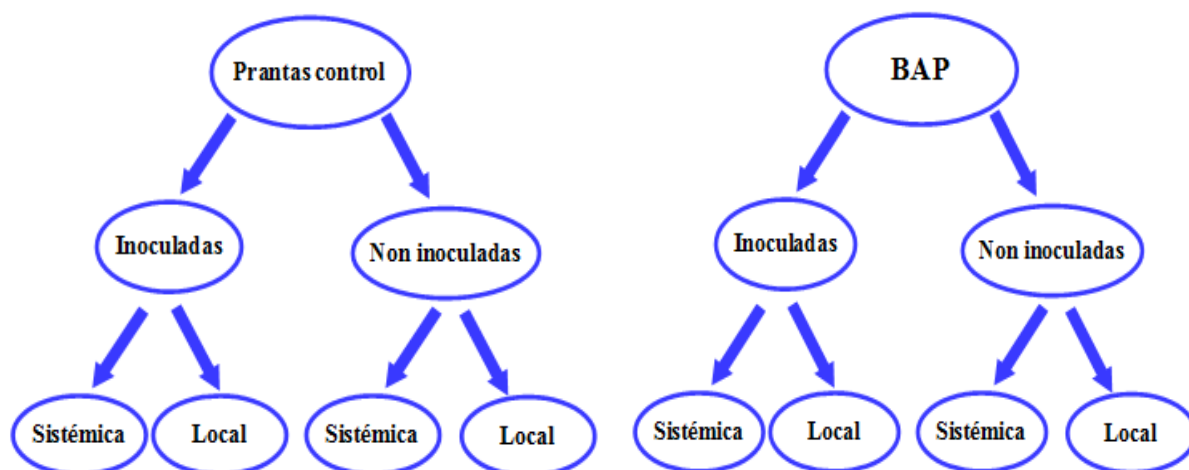


Fig.7. Esquema que ilustra os tratamentos realizados así como os diferentes tipos de mostras recollidas.

3.6.Extracción e determinación de compostos fenólicos

O primeiro paso na determinación dos compostos fenólicos, consistiu na homoxeneización de cada unha das mostras conxeladas nun morteiro con 15ml de metanol 80%. O homoxeneizado resultante recolleuse nunha botella de 100ml de vidro, que se incubou a 70°C durante 15 minutos para, a continuación, ser filtrado a través de filtros de papel de laboratorio. Este extracto filtrado enrasouse a un volume final de 20ml, sendo esta a solución final que se empregou como mostra para o análise dos fenois.

Para a determinación da concentración dos fenois, preparáronse varios tubos eppendorf: dúas réplicas para o branco e tres para cada mostra do experimento. O branco consta de 50µl de metanol 80%, aos que posteriormente se lle engadiron 750µl de auga e 50µl

de Reactivo de Folin-Ciocalteu. Nos tubos eppendorf correspondentes ás mostras, incluíronse 50 μ l do extrato da mostra xunto con 750 μ l de auga e 50 μ l do Reactivo de Folin-Ciocalteu. A continuación, axitouuse cada un dos tubos por inversión e incubáronse durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, engadíronse 150 μ l de Na₂CO₃ 20%, volveuse a axitar cada un dos tubos por inversión, e incubáronse a temperatura ambiente durante 2h. Por último, realizouse a medición da absorbancia do contido dos tubos no espectrofotómetro a 760nm, axustando a cero mediante o emprego do branco.

De forma complementaria, realizáronse unha serie de dilucións de ácido gálico, de concentracións coñecidas, que se empregaron para formar unha recta de calibrado, a cal será a base para o cálculo das concentracións que presentan as mostras do noso traballo.

3.7. Análise estadístico.

O tratamento estadístico dos datos, realizouse empregando o paquete estadístico Statgraphics Centurion XVII. Os datos referentes á area de tecido enfermo analizáronse cunha proba W de Mann-Whitney cun $\alpha=0,05$, para realizar a comparación dos resultados acadados no grupo control e BAP. Para os fenois, o test realizado foi unha ANOVA de dúas vías, xa que nos permite ver e comparar as posibles interaccións entre os tratamentos de inoculación e indución.

4.Resultados

4.1.Efecto da Benciladenina sobre os síntomas causados por *Phytophthora capsici*.

Durante o experimento diferenciáronse dous grupos de plantas, o control e o inducido con BAP. En cada un dos grupos, pulverizouse unha folla de cada planta e logo inoculáronse ambas follas con *P. capsici*. Neste caso, realizouse unha medición do diámetro da zona infectada ás 24, 48 e 72h trala inoculación, e calculouse a área enferma en cada planta a nivel local e sistémico.

Se comparamos as áreas enfermas do grupo control e BAP a cada unha das horas ás que se realizou a medición, vemos que a nivel local sí se observaron diferencias estatisticamente significativas entre os tratamentos a todos os tempos (p-valor= 0,0373, 0,0061 e 0,0009). A nivel sistémico os resultados do estatístico son diferentes posto que, si apareceron diferencias significativas entre BAP e control nos tempos de 24h e 48h (p-valor= 0,0262 e 0,0014), pero non ocorre o mesmo ás 72h trala inoculación, resultados para os que non se atoparon diferencias estatísticas significativas (p-valor= 0,7508).

4.2. Efecto da Benciladenina sobre o contido en compostos fenólicos.

Os resultados do proceso de extracción e determinación de compostos fenólicos, ao igual que os do tratamento con benciladenina, foron sometidos a un análise estatístico. Neste caso os datos tratáronse mediante unha ANOVA multifactorial na que os factores empregados foron: por unha banda se as mostras estaban inoculadas ou non, e pola outra, se as plantas pertencían ao grupo control ou ao grupo tratado con BAP.

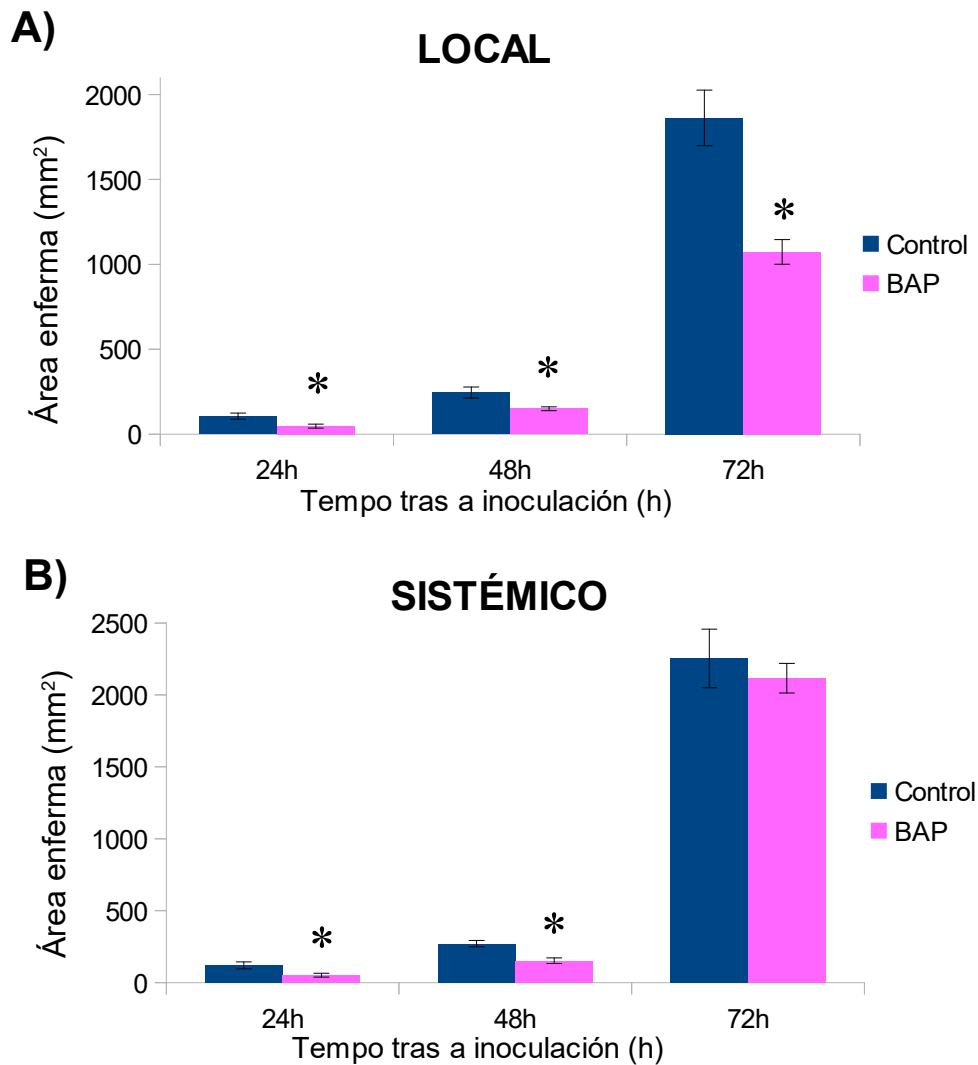


Fig.8. Área enferma 24h, 48h e 72h trala inoculación con *Phytophthora capsici* no grupo control e tratado con BAP; diferenciando entre os resultados obtidos a nivel local (A) e sistémico (B). Os datos representan as medias \pm o seu erro estándar (n=12). Os asteriscos indican diferencias significativas respecto do control nun test W de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Na figura 9 represéntanse os valores de concentracións de compostos fenólicos obtidos durante a experimentación, así como os correspondentes ao análise estatístico.

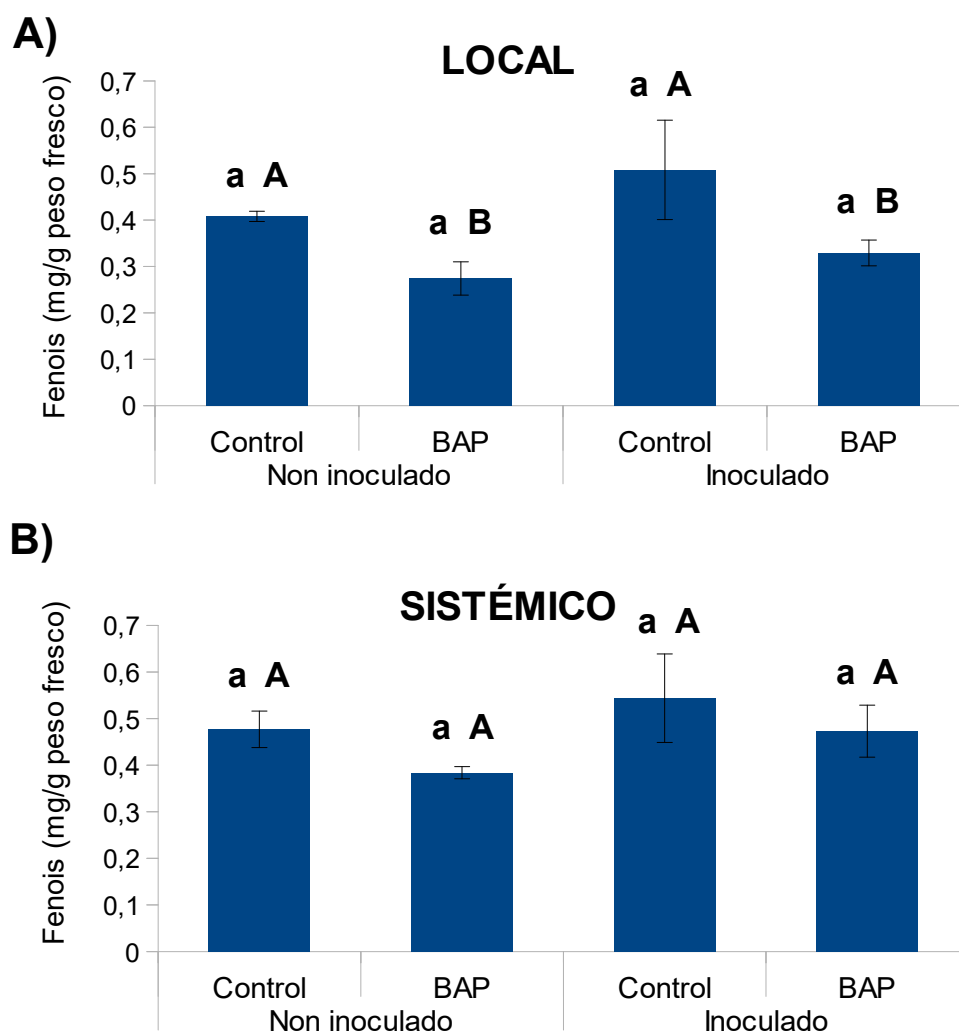


Fig.9. Efecto do BAP no contido en fenois das follas, diferenciando entre os datos das mostras a nivel local na gráfica A, e os obtidos a nivel sistémico na gráfica B. Os datos representados correspóndense coas medias \pm o seu erro estándar ($n=3$). Nas gráficas diferéncianse 2 tipos de letras: 1) minúsculas: letras correspondentes ao factor inoculado/non inoculado con *P. capsici* que se incluíu na proba estatística. 2) maiúsculas: letras correspondentes ao factor control/BAP empregado na ANOVA multifactorial. As letras diferentes dentro do mesmo grupo indican diferencias significativas no test estatístico realizado.

A nivel local, a ANOVA multifactorial revela diferencias estatisticamente significativas entre os datos das plantas do grupo control e BAP (p -valor= 0,0279), pero non se comparamos plantas inoculadas e non inoculadas (p -valor= 0,2205). Pola contra, os resultados obtidos a nivel sistémico non mostran diferencias significativas para ningunha das agrupacións (p -valor= 0,1272 no caso da comparanza plantas control e BAP; p -valor= 0,3358 para o caso das mostras inoculadas e non inoculadas). En ningún caso se atoparon interaccións significativas entre o tratamento de indución e o de inoculación.

5. Discusión

As citocininas, como menciona Azcón-Bieto *et al.* (2008), van estar implicadas en diferentes procesos do desenvolvemento vexetal, pero tamén xogan un papel de importancia nas interaccións planta-patóxeno. Existen estudos nos que se comprobou a eficacia da benciladenina fronte a diferentes patóxenos. Mishra *et al.* (2008) viron como a aplicación esóxena desta citocinina era eficaz contra o desenvolvemento de *Phytophthora colocasiae* na planta do taro, debido a un efecto funxicida provocado polas citocininas. No noso caso, para excluír este tipo de efecto sobre *P. capsici*, realizouse unha análise a nivel local e sistémico.

En canto aos resultados obtidos neste traballo, estes mostraron como a aplicación esóxena de citocininas leva a unha diminución dos síntomas que presenta a planta. Un dos aspectos analizados foi a área enferma ás 24, 48 e 72 horas trala inoculación. No intervalo 48-72h produciuse un forte aumento da área afectada, tanto a nivel local como sistémico; pero será só a nivel local onde as diferenzas entre o grupo control e inducido co BAP mostren diferenzas significativas en todos os tempos analizados. A nivel sistémico aparecen diferenzas estatisticamente significativas ás 24h e 48h trala inoculación. Cos puntos anteriores como base, podemos deducir que o efecto da aplicación das citocininas é maior a nivel local que sistémico. Isto pode deberse a que na folla tratada ademais dun proceso de resistencia inducida se produza un efecto funxicida como o que se observou no traballo de Mishra *et al.* (2008), elemento que non se desenvolve a nivel sistémico, o que fai que a protección fronte ao patóxeno a este nivel sexa menor.

Parte do efecto positivo que o BAP xera sobre a resistencia que a planta ofrece ao patóxeno, podería explicarse mediante a relación das citocininas coa ruta de resposta dependente do ácido salicílico, como obsevaron Nassem e Dandekar (2012) en *Arabidopsis*. No referente a este último punto, demostrouse que a aplicación esóxena de citocininas aumenta a protección da planta fronte a patóxenos necrotrofos e biotrofos. Isto suxire que a sinalización por parte das citocininas vai reforzar a inmunidade mediada por SA. Esta relación entre os niveis do ácido salicílico e os das citocininas foi estudada por Choi *et al.* (2011), o cal demostrou como a aplicación esóxena de t-zeatina en *Arabidopsis* leva a un incremento nos niveis de ácido salicílico, o que ten un efecto positivo na inmunidade que presenta a planta fronte ao patóxeno. Esta interacción tamén mostrou resultados de aumento da resistencia na planta do arroz contra o fungo *Magnaporthe oryzae*, ao igual que ocorre en *Arabidopsis* fronte ao patóxeno hemibiotrofo *Verticillium longisporum* (Nassem *et al.*, 2015).

Pero existen outras posibles explicacións, Grokinsky *et al.* (2011) demostraron que en tabaco, as citocininas van mediar no proceso de protección de xeito independente da ruta do salicílico. Os mecanismos implicados comprenderían: a xa comentada presenza de actividade antimicrobiana nas citocininas (evitando o crecemento do patóxeno), indución da síntese de fitoalexinas con actividade bactericida, así como a resistencia mediada por NPR1. Este último punto tamén se observou no traballo de Naseem & Dandekar (2012).

Para intentar esclarecer o mecanismo involucrado na acentuación da resistencia a *Phytophthora capsici*, realizáronse os experimentos de determinación de compostos fenólicos, os cales mostraron unha diminución da concentración nos grupos inducidos en referencia aos control. Para explicar esta caída, pódense barallar varias hipóteses; o descenso dos fenóis pode vir dado por un aumento da biosíntese de lignina, un composto fenilpropanoide. O aumento da lignificación é unha resposta común das plantas fronte ao ataque dun patóxeno, xa que vai representar unha barreira non degradable mecánicamente para os mesmos. Os fenóis son un dos elementos precursores da lignina, polo que a súa diminución pode ser debida ao aumento na biosíntese e deposición de lignina como resposta á presenza de *Phytophthora capsici* na superficie foliar (Moura, 2010; Rey, 2014).

O estado REDOX que presenta o tecido é outro dos factores que poderían explicar os datos obtidos no noso traballo para os fenóis. As especies reactivas de osíxeno (ROS) son un elemento modulador do estado REDOX así que van xogar un papel importante nas diferentes respostas ao estrés biótico e abiótico (Grosskinsky *et al.*, 2011). A variación nos niveis de ROS poden ser a explicación para a caída dos fenóis que se observou nos nosos resultados. As especies reactivas de osíxeno son altamente oxidantes que poden causar danos celulares se se atopan en altas concentracións, debido a isto, na planta vanse consumir axentes

antioxidantes como os fenóis; o que explicaría os resultados obtidos no traballo (Smith *et al.*, 2010). Por outra banda, o ácido salicílico vai regular a actividade do xen NPR1 mediante cambios redox relacionados coa xeración de especies reactivas de osíxeno (ROS), as cales van modificar o estado oxidativo do xen e por tanto a activación da vía SAR (Velooso *et al.*, 2013). O ambiente oxidante vai ser por tanto, o elemento necesario para que se desencadee esta defensa na planta; deste xeito, o descenso de fenóis que se observou na experimentación pode ser unha resposta para permitir o desenvolvemento normal do proceso de defensa dependente do ácido salicílico.

Os resultados obtidos neste traballo, mostran claras diferencias entre as respostas observadas a nivel local e sistémico fronte á infección con *Phytophthora capsici*. Como se mencionou, estes contrastes poden explicarse por un efecto funxicida a nivel local, que fai que a resposta sexa maior na folla tratada que na sistémica. Por outra banda, entre o grupo control e BAP, tamén apareceron diferencias estatisticamente significativas a nivel sistémico en canto á superficie de área enferma, demostrando que a bencilaminopurina vai ter efectos positivos sobre a resposta da planta ante o patóxeno. No tocante ao análise de compostos fenólicos, este permitiunos ver que se producía un descenso nos niveis dos mesmos nas mostras non inoculadas. O aumento da lignificación como resposta á infección así como o papel dos fenóis como antioxidantes dentro do equilibrio REDOX dos tecidos, son as posibles explicacións que se barallaron; pero para comprobar estas hipóteses sería necesaria a realización de máis análises.

6. Conclusións

1. A aplicación esóxena de Bencilaminopurina na superficie foliar de *Phaseolus vulgaris* L. (feixón), confir protección a nivel sistémico e local fronte á infección de *Phytophthora capsici*; podendo diferenciar unha maior diminución dos síntomas a nivel local, o cal pode vir dado por un posible efecto funxicida que non se produce a nivel sistémico.

2. A pulverización de citocininas sobre a superficie das follas da planta do feixón (*Phaseolus vulgaris* L.), diminúe os niveis de compostos fenólicos a nivel local entre os grupos control e BAP, pero non ocorre o mesmo a nivel sistémico.

7. Bibliografía

- Azcón-Bieto, J., Talón, M.** (2008) Fundamentos de fisiología vegetal, 2ª Edición. McGraw-Hill Interamericana, España. pp.421-444, 577-598.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S. Y., Geiser, D. M. & Kang, S.** (2008) A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45: 266-277.
- Baysal, O. Turgut, C. Mao, G.** (2005). Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. *Biologia Plantarum* 49:599-605.
- Bowers, J. H., Papavizas, G. C. & Johnston, S. A.** (1990) Effect of soil temperature and soilwater matric potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. *Plant Disease* 74: 770-780.
- Cavalier-Smith, T.A.** (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73: 203-265
- Choi, J., Choi, d., Lee, s., Ryu, C.M.** (2011) Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends?. *Trends in Plant Science* 16: 388-394.
- Díaz, J., Silvar, C., Varela, M.M., Bernal, A., Merino, F.** (2005). *Fusarium* confers protection against several mycelial pathogens of pepper plants. *Plant Pathology* 54: 770-782.
- Díaz Leal, J. L.** (2012). Caracterización molecular del metabolismo del alantoato en judía (*Phaseolus vulgaris*). Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.
- García-Jiménez, J., Monte, E. & Trapero, A.** (2010). Los hongos y Oomicetos fitopatógenos. En: Enfermedades de las plantas casadas por hongos y oomicetos. Jiménez Díaz, R. M. & Seguí, E. M. (eds.) 24-50. SEF-Phytoma, Valencia, España.
- Gevens A., Roberts P., McGovern R.J., Kucharek T.A.** (2010). Vegetable diseases caused by *Phytophthora capsici* in Florida. University of Florida, IFAS Extension, SP159.
- Grossinsky, D., Naseem, M., Abdelmohsen, U., Plickert, N., Engelke, T., Griebel, T., Zeier, J., Novák, O., Stmad, 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 Physiology* 157: 815–830 .
- Hann, D.R., Domínguez-Ferreras, A., Motyka, V., Dobrev, P.I., Schornacks S., Jehle, A., Felix, G., Chinchilla, D., Rathejen, J.P., Boller, T.** (2014) The pseudomonas type III effector HopQ1 activates cytokinin signaling and interferes with plant innate immunity. *New Phytologist* 201: 585-598.
- Hausbeck, M.K., Lamour, K.H.** (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease* 12: 1292-1305.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.c., Pegler, D.N.** (1995). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th ed. Wallingford, UK: CAB International.

- Hoagland D.R., Arnon D.I.** (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1-32.
- Jiménez-Díaz, R. M. & Zabalgoageazcoa, I.** (2010) Infección y patogénesis en las micosis vegetales. En: Jiménez Díaz R.M., Seguí E.M. Eds, Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. SEF-Phytoma, Valencia, España 50-82.
- Lamour, K.H., Hausbeck, M.K.** (2003). Effect of crop rotation on the survival of *Phytophthora capsici* and sensitivity to mefenoxam. *Plant Disease* 87: 841-846.
- Lamour, K.H., Julietta Jupe, R.S. & Huitema, E.** (2012) The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13: 329-337.
- Li, P., Feng, B., Wang, H., Tooley, P.W., Zhang, X.** (2011). Isolation of nine *Phytophthora capsici* pectin methylesterase genes which are differentially expressed in various plant species. *Journal of Basic Microbiology* 51: 60-70.
- Lois, M.** (2015). Caracterización de la respuesta de inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* Leon. en judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) por un cultivo esterilizado de Fo47. Trabajo Final de Master. Universidade da Coruña.
- Mishra A.K., Sharma K., Misra R.S.** (2008). Effect of Benzyl Amino Purine on the purine on the pathogen growth and disease development of taro leaf blight caused by *Phytophthora colocasiae*. *Journal of Plant Pathology* 90: 191- 196.
- Moura, JCMS., Valencise, CA., De Oliveira, J., Carnier, M., Mazzafera, P.** (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 360–376.
- Nassem, M., Kaldorf, M., Dandekar, T.** (2015). The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *Journal of Experimental Botany* Vol. 66, No. 16: 4885–4896.
- Nassem, M., Thomas, D.** (2012). The role of Auxin-Cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLOS Pathogens* 8: e1003026. DOI 10.1371/journal.ppat.1003026
- Olmedilla-Alonso B., Pedrosa M.M., Cuadrado C., Brito M., Asensio-S-Manzanera C., Asensio-Vegas C.** (2013). Composition of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris*), 'Almonga' and 'Curruquilla', and their postprandial effect in type 2 diabetics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:1070-1084.
- Pardo J.** (2013). Ensayo de un extracto de eucalipto como fungicida frente a *Phytophthora capsici*. Trabajo Final de Grado. Universidade da Coruña.
- Russell, J., Ougham, H., Thomas, H., Waaland, S.** (2013) The molecular life of plants. American Society of Plant Biologists. Wiley-Blackwell pp.342-349.
- Sánchez, M.E., Fernández-Rebollo, P., Trapero, A.** (2010). Podredumbre radical de la encina y el alcornoque. En: Jiménez Díaz R.M., Seguí E.M. Eds, Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. SEF-Phytoma, Valencia, España pp.130-165.

Santalla M., Fueyo M.A., Rodino A.P., Montero I. (1999). Breeding for culinary and nutritional quality of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in intercropping systems with maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 3: 225-240.

Smith, A., Coupland, G. Dolan, L., Harberd, N., Jones, J. Martin, C., Sablowski, R., Amey, A. (2010). Plant Biology. *Garland Science* pp. 500-506, 516-518.

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M., Murphya, A. (2015). Plant physiology and development (6th edition). *Sinauer Associates Inc* pp. 421-433, 682-684.

Veloso, J., García, T., Bernal, A., Díaz, J. (2013). New bricks on the wall of induced resistance: salicylic acid receptors and transgenerational priming. *European Journal of Plant Pathology* 138: 685-693.

Walters, D.R., Ratsep, J., Havis, N.D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany* 64: 1263-1290.

Zeller, W. (2006). Status on induced resistance against plant bacterial diseases. *Fitosanidad* 10: 99-103.