



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

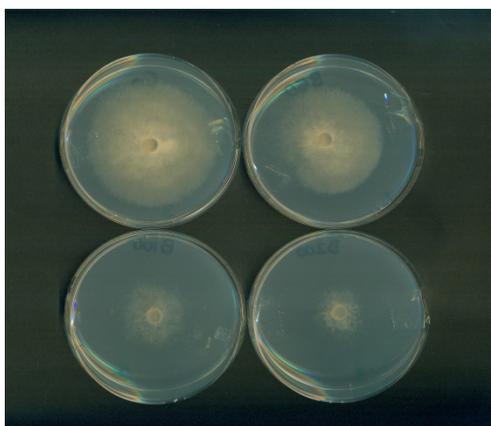
FACULTAD DE CIENCIAS

MEMORIA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

Propiedades de la bencilaminopurina para el control de *Botrytis cinerea* en judía: actividad fungicida e inducción de resistencia.

Propiedades da bencilaminopurina para o control de *Botrytis cinerea* en feixón: actividade funxicida e indución de resistencia.

Properties of benzylaminopurine to control *Botrytis cinerea* in bean: fungicide activity and induced resistance



María Coteló Morales

Junio de 2016

Tutores del trabajo: José Díaz Varela y Javier Veloso Freire



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 MARÍA COTELO MORALES e titulado

“Propiedades da bencilaminopurina para o control de *Botrytis cinerea* en feixón: actividade funxicida e indución de resistencia”

“Propiedades de la bencilaminopurina para el control de *Botrytis cinerea* en judía: actividad fungicida e inducción de resistencia”

“Properties of benzylaminopurine to control *Botrytis cinerea* in bean: fungicide activity and induced resistance”

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 20 de Xuño 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: 2016.06.20 11:06:22 +02'00'

Asdo. José Díaz Varela

VELOSO
FREIRE
JAVIER -
44836782F

Firmado digitalmente por
VELOSO FREIRE JAVIER -
44836782F
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=44836782F,
sn=VELOSO FREIRE,
givenName=JAVIER, cn=VELOSO
FREIRE JAVIER - 44836782F
Fecha: 2016.06.20 11:03:33
+02'00'

Asdo. Javier Veloso Freire

INDICE:

RESUMEN:	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. <i>Botrytis cinerea</i>	4
1.2. Judía (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	6
1.3. Citoquininas.....	7
1.4. Resistencia inducida	8
1.5. Hormonas y resistencia.	9
1.6. Citoquininas y resistencia.....	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1. Material vegetal.	11
3.2. Material fúngico.	11
3.3. Ensayos de severidad.	11
3.3.1 Inducción del material vegetal.	11
3.3.2 Inoculación y determinación de síntomas.	12
3.4. Ensayos enzimáticos.....	12
3.4.1. Inducción y toma de muestras.	12
3.4.2. Extracción de proteínas.....	12
3.4.3. Determinación de la actividad peroxidasa.	13
3.5. Ensayo del efecto fungicida de la BAP.	13
3.5.1. Cálculo de la ED ₅₀ de la BAP como fungicida.....	13
3.5.2. Efecto de la L-metionina sobre la actividad fungicida de la BAP.	13
3.6. Análisis estadístico.	14
4. RESULTADOS	14
4.1. Ensayos de severidad.	14
4.2. Ensayos enzimáticos.....	15
4.3. Ensayo del efecto fungicida de la BAP.	15
4.3.1. Determinación de la ED ₅₀ de la BAP frente a <i>B.cinerea</i>	15
4.3.2. Efecto de la metionina sobre sobre la actividad fungicida de la BAP	16
5. DISCUSIÓN.....	18
6. CONCLUSIONES	20
Castellano:.....	20
Inglés:	20

7. BIBLIOGRAFÍA..... 21

RESUMEN:

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno con estilo de vida necrotrofo que afecta a un amplio rango de huéspedes, entre los que se incluye *Phaseolus vulgaris*. Los objetivos de este trabajo fueron: comprobar experimentalmente si la aplicación exógena de bencilaminopurina (BAP) a las hojas de judía confiere protección frente al hongo y si tiene algún efecto sobre la actividad peroxidasa, calcular la ED₅₀ de la BAP como fungicida frente a este hongo y determinar si ese efecto fungicida se debe a la inhibición de la síntesis de metionina en el hongo. Los resultados obtenidos apuntan a que la aplicación exógena de BAP sí confirió protección, al reducir significativamente el área de la lesión. También causó un incremento en los niveles de actividad peroxidasa, lo que sugiere la inducción de resistencia en la planta. Además la BAP tuvo un efecto fungicida sobre *B. cinerea*. La ED₅₀ obtenida en el presente estudio fue de 85,52 µM. Por último, se comprobó que el modo de acción de la BAP como fungicida no es la inhibición de la síntesis de metionina del hongo.

RESUMO:

Botrytis cinerea é un fungo fitopatóxeno cun estilo de vida necrotrofo que afecta a un amplo rango de hóspedes, entre os que se inclúe *Phaseolus vulgaris*. Os obxectivos deste traballo foron: comprobar experimentalmente se a aplicación esóxena de bencilaminopurina (BAP) ás follas de feixón confire protección fronte ó fungo e se ten algún efecto na actividade peroxidasa, calcular a ED₅₀ da BAP como funxicida fronte a este fungo e determinar se ese efecto funxicida débese á inhibición da síntese de metionina do fungo. Os resultados obtidos apuntan a que a aplicación esóxena de BAP si conferiu protección, ó reducir significativamente a área da lesión. Tamén causou un incremento nos niveis de actividade peroxidasa, o que suxire a indución de resistencia na planta. Ademais, a BAP tivo un efecto funxicida sobre *B. cinerea*. A ED₅₀ obtida no presente estudio foi de 85,52 µM. Por último, comprobouse que o modo de acción da BAP como funxicida non é a inhibición da síntese de metionina do fungo.

ABSTRACT:

Botrytis cinerea is a phytopathogen fungus with necrotroph life style which affects a wide range of hosts, including *Phaseolus vulgaris*. The goals of this work were: to test if exogenous application of benzylaminopurine (BAP) to bean leaves confers protection against the fungus and if it has any effect on the peroxidase activity, to calculate the ED₅₀ of the BAP as a fungicide against fungus and to determine if the fungicidal effect is due to the inhibition of the synthesis of methionine in the fungus. The results suggest that exogenous application of BAP provided protection by significantly reducing the lesion area. Moreover, it caused an increase in peroxidase activity levels, suggesting the induction of plant resistance. Furthermore, BAP had a fungicide effect on *B. cinerea*. The ED₅₀ obtained in the present study was 85.52 µM. Finally, it was found that the mode of action of BAP as a fungicide is not the inhibition of methionine synthesis in the fungus.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. *Botrytis cinerea*.

Botrytis cinerea Pers.: Fr es un hongo fitopatógeno con un estilo de vida necrotrofo que ataca a más de 200 cultivos. Su estado sexual reproductivo se denomina *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. Tiene una gran plasticidad genética y, debido a ello, muchos de los fungicidas que se han utilizado para su control han dejado de ser eficaces, al desarrollar el hongo resistencia a los mismos. Esta especie se utiliza como un modelo para el estudio de los hongos necrotrofos (Williamson *et al.*, 2007).

Clasificación taxonómica: reino: Fungi; phylum: Ascomycota; subphylum: Pezizomycotina; clase: Letiomycetes; orden: Helotiales; familia: Sclerotiniaceae; género: *Botrytis*; especie: *Botrytis cinerea*.

Como ya hemos dicho, *B. cinerea* es un patógeno necrotrofo, lo que significa que durante el proceso de infección mata los tejidos de la planta y se alimenta de ellos, para lo cual necesita producir enzimas líticas que causen la rotura de los tejidos. Su rango de huéspedes es muy amplio y se debe, básicamente, a la capacidad del hongo para contrarrestar la acción tóxica de una amplia gama de metabolitos de plantas. Además, es fácil de cultivar axénicamente, es decir, es fácil de obtener un cultivo puro de esta especie (Smith *et al.*, 2010).

En el proceso de infección, *B. cinerea* desarrolla unas estructuras de infección denominadas apresorios (Fig. 1) que rompen la cutícula de la superficie de las hojas para poder penetrar. *Botrytis* no puede penetrar por simple fuerza mecánica ya que su apresorio no produce la cantidad suficiente de melanina como para ejercer una gran presión de turgencia que permita dicha penetración (van Kan, 2006). Por ello, el apresorio de *Botrytis* secreta enzimas, como cutinasas y lipasas, para romper ese tejido. De hecho, se ha visto que la especie contiene al menos cinco genes que codifican para cutinasas y una docena de genes que codifican para lipasas. Además, la pared celular de la planta es muy rica en pectinas, por lo que para que el hongo penetre es necesario que produzca enzimas pectinasas, en concreto, la BcPG2 endopoligalacturonasa (van Kan, 2006). Esta enzima rompe los enlaces entre los residuos de ácido D-galacturónico generando homogalacturonano no metilado y causa así la separación de las células y la maceración de tejidos, resultando en el típico síntoma denominado podredumbre blanda. Las endopoligalacturonasas de *B. cinerea* son codificadas por una familia de al menos seis genes (Manfredini *et al.*, 2006).



Fig. 1: Apresorios de *B. cinerea* penetrando en tejidos (van Kan, 2006).

Botrytis cinerea es el agente causal de la podredumbre gris y ataca a gran cantidad de plantas de gran importancia tanto a nivel social como a nivel económico, como es el caso, por ejemplo, de la vid (Fig. 2). De hecho, el término *botrys* significa racimo o grupo de uvas y el término *cinerea* viene de ceniza, pues provoca la aparición en las plantas de un polvillo gris que se asemeja mucho a la ceniza.



Fig. 2: Frutos de la vid infectados con *B. cinerea*. Tomado de: https://es.wikipedia.org/wiki/Botrytis_cinerea

B. cinerea es responsable de una amplia gama de síntomas. Quizás los más típicos en las hojas y los frutos de baya son: podredumbre gris (Fig. 3), colapso e invasión por agua del parénquima, seguido de una rápida aparición de masas grises de conidios (Williamson *et al.*, 2007).



Fig. 3: Podredumbre gris en fresas. Tomado de: https://es.wikipedia.org/wiki/Botrytis_cinerea

Para producir la muerte de las células, este patógeno puede producir diferentes sustancias. Una de ellas es una toxina denominada botridial, que incrementa la virulencia de este hongo al ser tóxica para las plantas. Otras sustancias que también son secretadas por el patógeno en el desarrollo de la enfermedad son el ácido oxálico y toxinas específicas de huésped. *B. cinerea* desencadena la respuesta oxidativa durante la penetración y la formación de las lesiones primarias. De hecho, la infección de las hojas de la planta de judía produce una acumulación de peróxido de hidrógeno y otros radicales libres muy reactivos que causa una perturbación masiva del potencial redox en y alrededor del tejido infectado, promoviendo así el desarrollo de la enfermedad (van Kan, 2006).

1.2. Judía (*Phaseolus vulgaris*).

La judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Fig. 4) es uno de los alimentos básicos más importantes en los países en desarrollo. En nuestro estudio se ha utilizado como huésped de la infección del patógeno debido a que es una especie de gran importancia económica cuyo cultivo está extendido por prácticamente todo el mundo (Fig. 5). De ahí que sea tan importante conocer la manera en la que *Botrytis* infecta a esta planta, cómo esta responde a él y cómo se puede combatir la enfermedad o producir resistencia.

Clasificación taxonómica: reino: Plantae; división: Magnoliophyta; clase: Magnoliopsida; subclase: Rosidae; orden: Fabales; familia: Fabaceae; subfamilia: Faboideae; género: *Phaseolus*; especie: *Phaseolus vulgaris*.



Fig.4: *Phaseolus vulgaris*.

Tomado de:

https://es.wikipedia.org/wiki/Phaseolus_vulgaris

A nivel de España, también es una especie importante económicamente, produciéndose unas 17.677 toneladas de judía en el año 2013 (FAOSTAT, 2016).

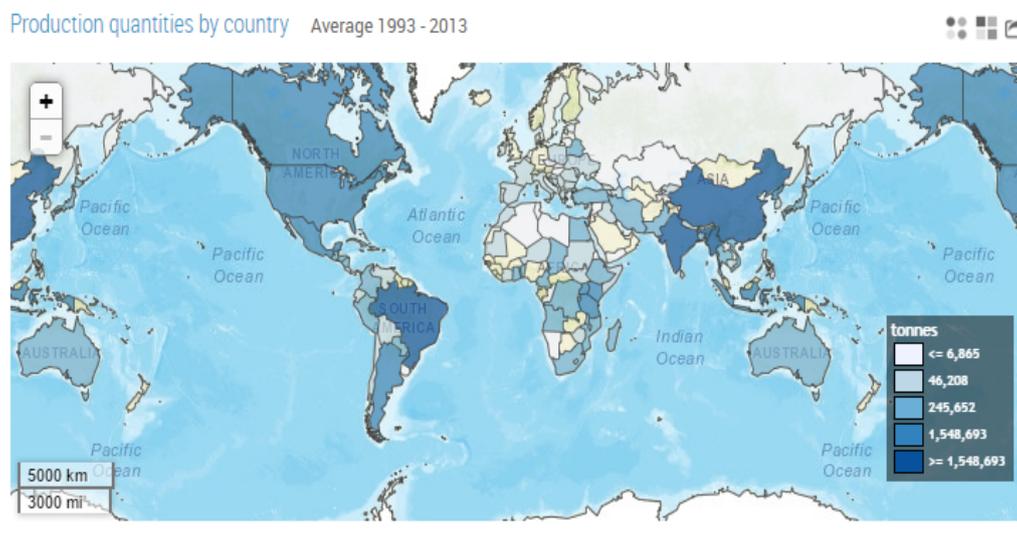


Fig. 5: Distribución del cultivo de judía en el mundo (FAOSTAT, 2016).

Como se puede ver en la figura 6, Europa es responsable sólo de un 2.6% del total de la producción mundial de judía. América, Asia y, en menor medida, África se sitúan como los continentes que más la producen.

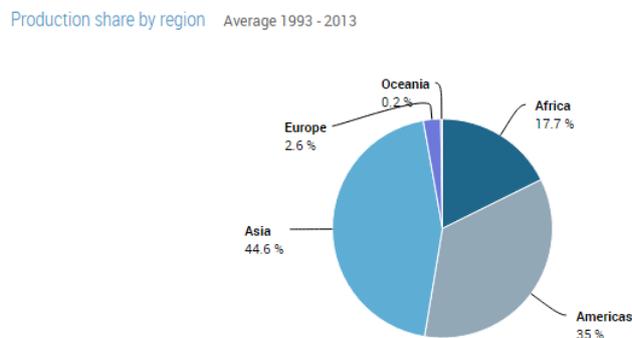


Fig. 6: Producción de judía por continente (FAOSTAT, 2016).

Entre los cinco países que más judía cultivan se encuentran: India, Brasil, Birmania (Myanmar), China y Estados Unidos (Fig. 7).

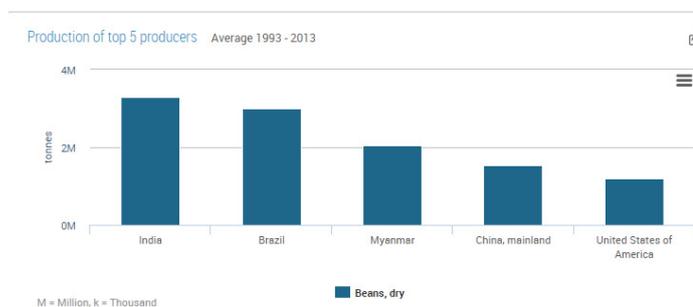


Fig. 7: Países con mayor producción de judía. (FAOSTAT, 2016).

1.3. Citoquininas.

Las citoquininas son unas hormonas vegetales que están implicadas en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos de la planta, que incluyen: senescencia de hojas, movilización de nutrientes, interacciones con otros organismos, etc. (Taiz *et al*, 2015).

Las citoquininas naturales son moléculas derivadas de la adenina con una cadena lateral unida al grupo amino 6 del anillo purínico. Las cadenas laterales pueden ser de

naturaleza isoprenoide o aromática. Las primeras son sintetizadas a partir de derivados del isopreno, como el dimetilalil difosfato (DMAPP) que procede o de la ruta del mevalonato o de la ruta del metileritritol fosfato (MEP).

Dentro de las citoquininas isoprenoides se encuentran la zeatina (Fig. 8), la isopenteniladenina y la dihidrozeatina. Entre las aromáticas se incluyen la bencilaminopurina (Fig. 9) y la topolina.

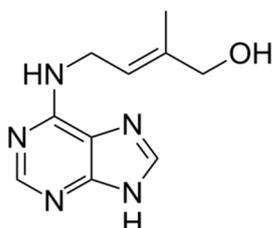


Fig. 8: Estructura química de la trans-zeatina.

Tomado de:

<https://es.wikipedia.org/wiki/Citoquinina>

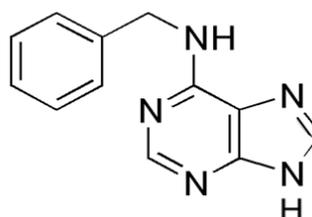


Fig. 9: Estructura química de la bencilaminopurina.

Tomado de: <https://en.wikipedia.org/wiki/6-Benzylaminopurine>

Los niveles de citoquininas en planta dependen básicamente del balance entre los siguientes procesos: transporte, conjugación, síntesis y degradación (Fig. 10).

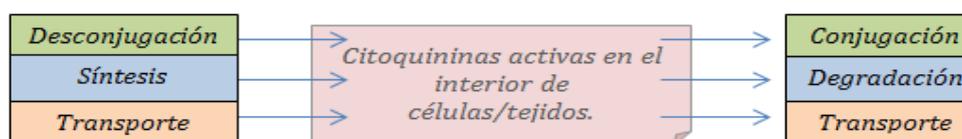


Fig. 10: Balance de citoquininas en células y tejidos.

En Arabidopsis, los receptores de las citoquininas son las proteínas CRE 1, AHK2 y AHK3, las cuales forman parte de un sistema de señalización de dos componentes complejo. La citoquinina se une a CRE1, que se localiza en el retículo endoplasmático en forma de dímero. La unión ocurre en el dominio que reside en el lumen del retículo endoplasmático del receptor, denominado CHASE. Se activa así la actividad histidín quinasa, fosforilando un aspartato del dominio receptor de CRE1. El fosfato se transfiere a una proteína citosólica llamada AHP (es una proteína histidina fosfotransferasa de Arabidopsis). Esta migra hacia el núcleo donde le cederá el fosfato a los residuos de aspartato de los dominios receptores de las ARR de tipo A y de tipo B. La fosforilación de las ARR de tipo B, activa el dominio de salida que induce la transcripción de genes ARR de tipo A. La fosforilación de las ARR de tipo A hace que se produzcan efectores que van a llevar a cabo la respuesta adecuada en la planta (Taiz *et al.*, 2015).

1.4. Resistencia inducida.

El concepto de resistencia inducida se puede definir como el incremento en la resistencia que se produce en una planta susceptible en respuesta a un estímulo externo sin que se produzcan cambios en el genoma. El estímulo externo puede ser biótico (por ejemplo la presencia de un patógeno o herbívoro), o abiótico (Smith *et al.*, 2010).

La resistencia puede ser de dos tipos:

- Local: la resistencia se produce sólo en la parte de la planta donde se encuentra el estímulo.
- Sistémica: la resistencia se produce en la planta completa.

Por otro lado, la resistencia inducida puede ser:

- Resistencia sistémica adquirida (SAR)
- Resistencia sistémica inducida (ISR)
- Resistencia inducida por herbívoros/heridas

La planta también tiene sistemas de inmunidad innata que se basan en unas proteínas receptoras de reconocimiento de patrones (PRRs) que detectan de manera específica los PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) que son unas señales estructurales que presenta el patógeno. Este tipo de resistencia se llama PTI (inmunidad desencadenada por PAMPs). Algunos patógenos se han adaptado a la PTI liberando moléculas llamadas efectores que inhiben esta respuesta. A su vez, algunas plantas han evolucionado para detectar estos efectores desarrollando así un segundo tipo de defensa, la ETI (inmunidad desencadenada por efectores). El reconocimiento de un efector por parte de la planta desencadena una respuesta de resistencia más rápida, más específica y de mayor intensidad que tras el reconocimiento de PAMPs (Denancé *et al.*, 2013).

1.5. Hormonas y resistencia.

La resistencia está regulada por fitohormonas. De hecho, hormonas como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) se consideran elementos fundamentales de la inmunidad. La ruta del ácido salicílico favorece la defensa de la planta frente a patógenos biotrofos, mientras que las rutas del jasmonato y etileno, proporcionan inmunidad frente a patógenos necrotrofos. Sin embargo, el papel de otras hormonas como citoquininas, auxinas y ácido abscísico en la defensa de la planta no está totalmente claro, se cree que modifican el equilibrio SA-JA/ET mediando la protección o susceptibilidad de la planta contra el patógeno (Naseem & Dandekar, 2012). Aún así, se sabe que todas las rutas de las fitohormonas están ligadas en una enorme y compleja red de interrelaciones (Denancé *et al.*, 2013).

1.6. Citoquininas y resistencia.

Es sabido que las auxinas y las citoquininas tienen papeles antagonistas en muchos procesos, y en la inmunidad también. Naseem y Dandekar (2012) proponen un modelo de acción antagonista de auxinas-citoquininas. En él, *Pseudomonas syringae* (un patógeno bacteriano) penetra en la planta, incrementando los niveles de auxinas, lo que provoca una atenuación de la ruta del ácido salicílico y, por lo tanto, disminuye la

resistencia frente a la infección. Además, los niveles altos de auxina van a bajar las concentraciones de citoquininas en las plantas, lo que aún incrementa más la susceptibilidad. Pero la aplicación exógena de citoquininas inhibe el transporte de auxinas y favorece la ruta del ácido salicílico, el cual va a incrementar los niveles del represor de las auxinas, AUX-IAA, haciendo que los niveles de auxinas bajen y, por lo tanto, se favorezca la resistencia. El porqué de este efecto antagonista entre ambas hormonas se puede deber a que las citoquininas activan a los ARR de tipo B, que estabilizan el represor AUX-IAA, suprimiendo así la respuesta a la auxina. Por otro lado, las auxinas activarían los ARR de tipo A que regulan negativamente la respuesta de las citoquininas.

El papel de las citoquininas en la regulación de la resistencia no es muy claro, pues ha habido estudios en los que el incremento de los niveles de citoquininas favorecen la resistencia contra las infecciones de *Botrytis cinerea* en plantas de tomate (Swartzberg *et al.*, 2008), mientras que en tabaco, el aumento de los niveles de citoquininas incluso incrementa la susceptibilidad a *Botrytis cinerea* (Grosskinsky *et al.*, 2011). Por ello parece que el papel de las citoquininas varía dependiendo de la especie de planta de la que se trate, reflejando una clara coevolución entre los patógenos y las plantas (Nafisi *et al.*, 2015).

El efecto de la bencilaminopurina (BAP) en *Phytophthora* se ha estudiado en algunos trabajos (Mishra *et al.*, 2009) y se ha visto que produce un descenso de la actividad endo β -1,3-glucanasa del patógeno, dificultando su crecimiento e inhibiendo el desarrollo de la enfermedad. En otro trabajo (Pardiño, 2016) se comprobó que la aplicación exógena de BAP inducía resistencia tanto a nivel local como sistémico en *Phaseolus vulgaris* frente a la infección de *Phytophthora capsici*, produciendo tanto una disminución del área del tejido enfermo como una reducción en los niveles de fenoles en la planta. Nosotros intentaremos estudiar si también produce una disminución del área del tejido enfermo contra el patógeno *Botrytis cinerea* y si induce una enzima relacionada con la defensa de la planta: la peroxidasa, que sirve como marcador de la resistencia inducida. Pero la resistencia inducida no ofrece una protección total a la planta, con lo cual debe ser utilizada junto con otras medidas de control, como los fungicidas (Walters *et al.*, 2005).

El uso de fungicidas para tratar las enfermedades causadas por hongos en los campos de cultivo se ha extendido a lo largo del mundo, el problema es que aquellos son relativamente fáciles de degradar por las bacterias del suelo, causan un gran impacto en muchos organismos contra los que no van dirigidos, causan contaminación de las aguas y suelos, y los patógenos suelen desarrollar mecanismos de resistencia a los fungicidas (Mishra *et al.*, 2009).

En un trabajo anterior (Rey, 2016) se llevaron a cabo ensayos con cultivos del patógeno *Botrytis cinerea* para comprobar el posible efecto fungicida de la BAP, llegando a la conclusión de que podría ser la causa de la protección observada en *Zinnia elegans* frente al hongo. Por ello, en el presente trabajo de fin de grado se calculará la dosis efectiva al 50% (ED₅₀) de la BAP como fungicida.

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Comprobar experimentalmente si la aplicación exógena de bencilaminopurina (BAP) a las hojas de judía confiere protección frente al hongo *Botrytis cinerea*.
2. Determinar si la aplicación de BAP a las plantas de judía ejerce algún efecto sobre la actividad peroxidasa, que es una enzima implicada en la resistencia de la planta a los patógenos.
3. Calcular la ED₅₀ de la BAP como fungicida frente a *Botrytis cinerea* y determinar si ese efecto fungicida se debe a la inhibición de la síntesis de metionina en el hongo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron diferentes tipos de ensayos para determinar la interacción entre *Phaseolus vulgaris* y *Botrytis cinerea*.

3.1. Material vegetal.

Se sembraron semillas de judía en perlita humedecida con solución nutritiva de Hoagland y Arnon (1950). Se pusieron a germinar en una cámara con un fotoperiodo de 16 horas de luz a una temperatura de 25°C y 8 horas de oscuridad a 18°C. A los siete días, se seleccionaron aquellas plantas con crecimiento más óptimo y se trasplantaron a pocillos de plástico con una mezcla de tierra y perlita en proporción 3:1 (V/V). A partir de ese momento se regaron con agua del grifo y se mantuvieron en la cámara en las mismas condiciones.

3.2. Material fúngico.

Se utilizó el aislado B0510 de *Botrytis cinerea* proporcionado por el Dr. J.A.L. van Kan (WUR, Países Bajos) y se mantuvo por repicados sucesivos en medio Patata Dextrosa Agar (PDA). Para los experimentos se dejó crecer durante 4 días en dicho medio en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente.

3.3. Ensayos de severidad.

3.3.1 INDUCCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

Cuatro días después de haber trasplantado las plántulas de judía, se procedió a su inducción con una solución de bencilaminopurina (BAP). Se partió de una solución stock 100mM de BAP en un solvente orgánico inocuo para las plantas y el patógeno, el DMSO (dimetilsulfóxido). Se diluyó en agua destilada hasta obtener una concentración final de 50 µM. Se dividieron las plantas en dos bandejas, la control y la tratamiento. Se

seleccionaron seis plantas para cada una de las bandejas. Se pulverizó cada hoja de las plantas control con 10 mL de una solución con DMSO al 0,05%. Las plantas con BAP fueron pulverizadas en cada hoja con 10 mL de una solución de BAP 50 μ M en 0,05% DMSO.

3.3.2 INOCULACIÓN Y DETERMINACIÓN DE SÍNTOMAS.

A las 24 horas tras el tratamiento con BAP, se inocularon las plantas con el hongo *Botrytis cinerea* con un sacabocados. Se obtuvieron discos de micelio de 5mm de diámetro de los cultivos del hongo y se pusieron dos discos en cada hoja de las plantas. Los discos se colocaron equidistantes en cada hoja. Las plantas se introdujeron en cajas con elevada humedad ambiental ya que el hongo la necesita para iniciar la infección, y se incubaron a temperatura ambiente. Posteriormente se midieron los diámetros de las lesiones causadas por *B. cinerea* a 48 y 72 horas tras la inoculación. A partir de los diámetros se calcularon las áreas de las lesiones. Se realizaron dos experimentos independientes con 4-6 plantas por tratamiento y experimento.

3.4. Ensayos enzimáticos.

Se realizaron otros tres experimentos adicionales en los que se siguió la misma metodología que en los ensayos de severidad, pero con ciertas variaciones con la finalidad de conseguir muestras de material vegetal para posteriormente medir la actividad de la enzima peroxidasa.

3.4.1. INDUCCIÓN Y TOMA DE MUESTRAS.

Tras haber inducido el material vegetal de la misma manera que antes, se procedió a separar las plantas en cuatro grupos: 3 plantas control sin inocular, 3 plantas control sí inoculadas, 3 plantas tratadas con BAP sin inocular y 3 plantas tratadas con BAP sí inoculadas. Se incubaron en cajas con alta humedad, al igual que en los ensayos de severidad.

A las 24 h tras la inoculación, se recogieron muestras de las hojas de cada grupo, se pesaron y se congelaron a -80°C.

3.4.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

Todos los pasos de extracción se realizaron en frío. Cada muestra se homogeneizó en un mortero con tampón Tris HCl 50mM + KCl 1M pH 7,5 añadiendo 10 mg de PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone) por gramo de muestra. Posteriormente, el extracto se filtró a través de una gasa.

A continuación, se centrifugó el filtrado a 12857 xg y 4°C durante 20 minutos. Seguidamente, se procedió al desalado de cada muestra haciéndola pasar a través de columnas de cromatografía de exclusión molecular PD-10 (GE Healthcare).

La columna se equilibró previamente con 25 mL de tampón TrisHCl 5mM pH 7,5. Luego se hicieron pasar por la columna 2,5 mL de muestra y, posteriormente, 3,5 mL del mismo

tampón. Es en ese momento en el que se procedió a la recolección de las muestras ya desaladas. Por último, se dividió el volumen de muestra tomado (3,5 mL) en 4 tubos eppendorf que se mantuvieron en el congelador a -80°C hasta la posterior medida de la actividad enzimática.

3.4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA.

Para determinar la actividad de esta enzima, se midió la absorbancia a 593 nm y 25 °C durante un intervalo de tiempo de 2 min. El blanco estará compuesto por 1 mL de tampón TrisHCl 5mM pH 7,5. La mezcla de reacción contenía: 915 µL de tampón TrisHCl 5mM pH 7,5, 10 µL de 4 metoxinaftol 100mM (4-MN, que será el sustrato de nuestra enzima), 25 µL de las muestras y 50 µL de H₂O₂ 6,6mM.

La actividad enzimática se expresó en U/g de Peso fresco.

3.5. Ensayo del efecto fungicida de la BAP.

3.5.1. CÁLCULO DE LA ED₅₀ DE LA BAP COMO FUNGICIDA.

Para el cálculo de ED₅₀ (dosis efectiva en la que se inhibe el crecimiento del hongo en un 50%) se procedió a cultivar el hongo en medios que contenían diferentes concentraciones de bencilaminopurina.

Se prepararon 4 medios con PDA: un medio control con un 0,5 % de DMSO, un medio con BAP 25 µM y 0,5% de DMSO, un medio con BAP 50 µM y 0,5% de DMSO y un medio con BAP 100 µM y 0,5% de DMSO.

El mismo día de la preparación del medio, se obtuvo la placa madre del hongo a partir de repicados. Días más tarde, y con la ayuda de un sacabocados de 5 mm, se obtuvieron discos de micelio que se pasaron a cada placa. Se midió el crecimiento del hongo a 24 h, 48 h y 72 h. Se realizaron dos experimentos independientes con cuatro placas por tratamiento y experimento.

La ED₅₀ se calculó a partir de la representación del % de inhibición del crecimiento del hongo a 72 h frente al logaritmo de la concentración de la BAP.

3.5.2. EFECTO DE LA L-METIONINA SOBRE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DEL BAP.

Con el objetivo de saber si la BAP tiene algún efecto sobre la síntesis de L-metionina del hongo *Botrytis*, preparamos medios de PDA, uno con 0,5% de DMSO (control), otro con BAP 50 µM y 0,5% DMSO, otro con L-metionina (MET) 200 µM y 0,5% DMSO y otro con BAP 50 µM y L-metionina 200µM, además del 0,5% de DMSO.

Los medios se sembraron con *B. cinerea* y se midió el crecimiento del hongo tal y como se expresó en el apartado 3.5.1. Se realizaron dos experimentos independientes con tres placas por tratamiento y experimento.

3.6. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los datos se hizo empleo del programa R. Se realizó un test de rangos de Wilcoxon ($\alpha=0,05$) para determinar si había diferencias significativas entre los datos referentes a las áreas de tejido enfermo de la planta del control y de la BAP. Para el análisis de la actividad peroxidasa y de los efectos de la BAP sobre la metionina, se realizó un ANOVA ($\alpha=0,05$) para determinar si existían diferencias significativas entre los cuatro tratamientos, y se realizó un test de Tukey ($\alpha=0,05$) para determinar entre qué tratamientos se presentaban las diferencias, pues realiza comparaciones dos a dos de las medias.

4. RESULTADOS

4.1. Ensayos de severidad.

Tras la realización del análisis se puede observar que tanto a 48 horas como a 72 horas, el área de la lesión producida en las hojas disminuye significativamente con el tratamiento exógeno de BAP con unos p-valores de $6,66 \cdot 10^{-6}$ y $0,0365$ respectivamente, tal y como se puede ver en la Fig. 11.

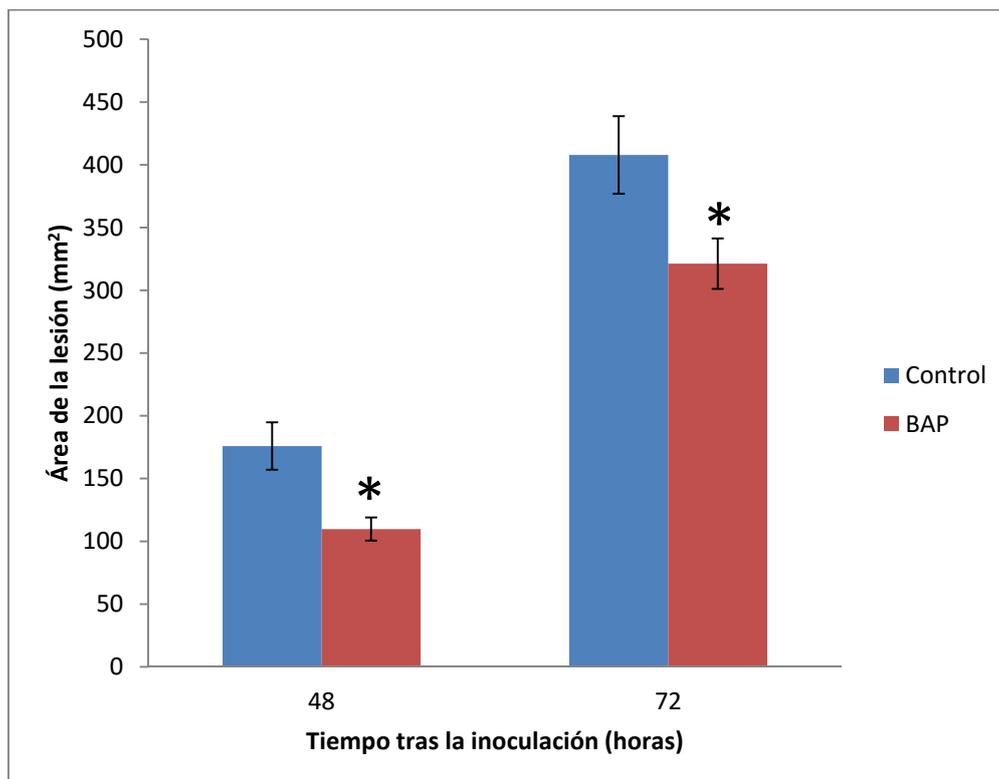


Fig. 11: Efecto del tratamiento con la BAP sobre la severidad de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea*. Los datos son las medias del área por lesión \pm el error estándar. Los asteriscos muestran la existencia de diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

4.2. Ensayos enzimáticos.

Tras la realización de la prueba ANOVA, se determinó que sí existían diferencias significativas entre los tratamientos con un p-valor de 0,00358. Se procedió a realizar un test de Tukey para comprobar entre cuáles de los tratamientos existen esas diferencias. Se comprobó que en el tratamiento con la BAP inoculado, la actividad peroxidasa se incrementa significativamente con respecto al control no inoculado (p-valor=0,005) y con respecto al BAP no inoculado (p-valor=0,008) (Fig. 12).

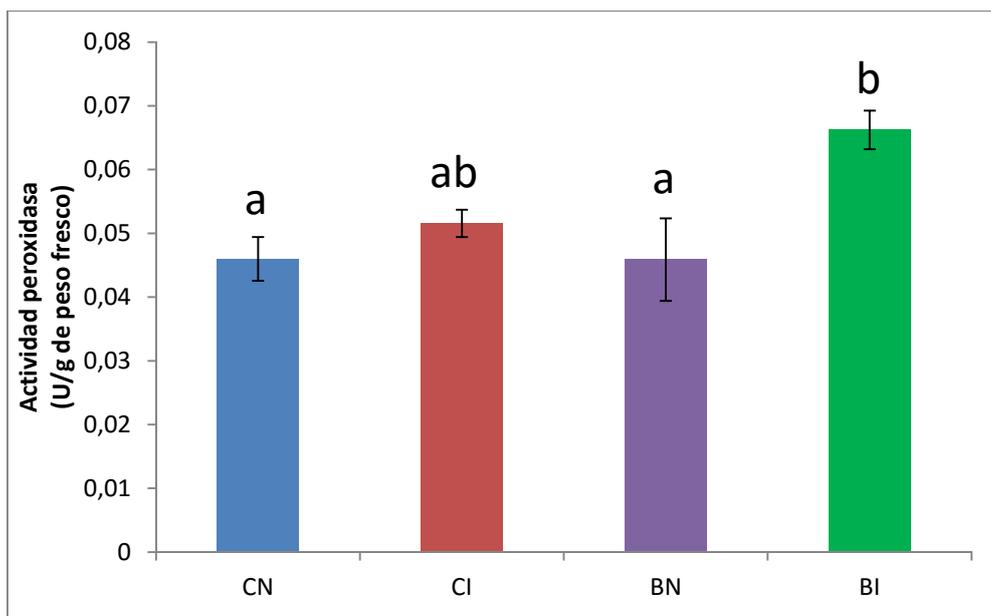


Fig. 12: Efecto del tratamiento con BAP sobre la actividad peroxidasa en las hojas (CN: control no inoculado con el hongo; CI: control inoculado con el hongo; BN: tratamiento con BAP sin inocular con el hongo; BI: tratamiento con BAP inoculado con el hongo) y sus errores estándar. Los tratamientos con letras diferentes muestran la existencia de diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

4.3. Ensayo del efecto fungicida de la BAP.

4.3.1. Determinación de la ED₅₀ de la BAP frente a *B.cinerea*.

La BAP inhibió el crecimiento de *B. cinerea* en distinta medida según la concentración (Fig. 13). Se realizó una gráfica que enfrentase el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo frente al logaritmo de la concentración de BAP. A continuación se obtuvo la recta de regresión que mejor se ajustase a nuestros datos muestrales, que es: %inhibición = $74,677 \times \log [\text{BAP}] (\mu\text{M}) - 94,281$. Teniendo en consideración la definición del término ED₅₀, se calculó el valor de la concentración de BAP correspondiente al 50% de la inhibición. El valor obtenido para la ED₅₀ fue 85,52 μM (Fig. 14).

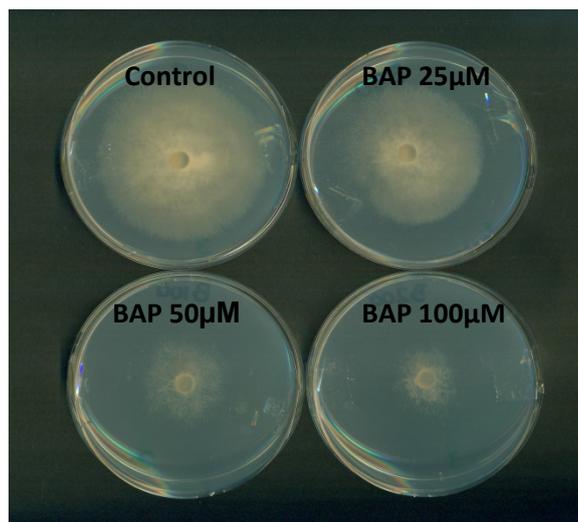


Fig. 13: Crecimiento de *B. cinerea* en presencia de BAP. Izquierda arriba: control; derecha arriba: BAP 25 μM ; izquierda abajo: BAP 50 μM ; derecha abajo: BAP 100 μM .

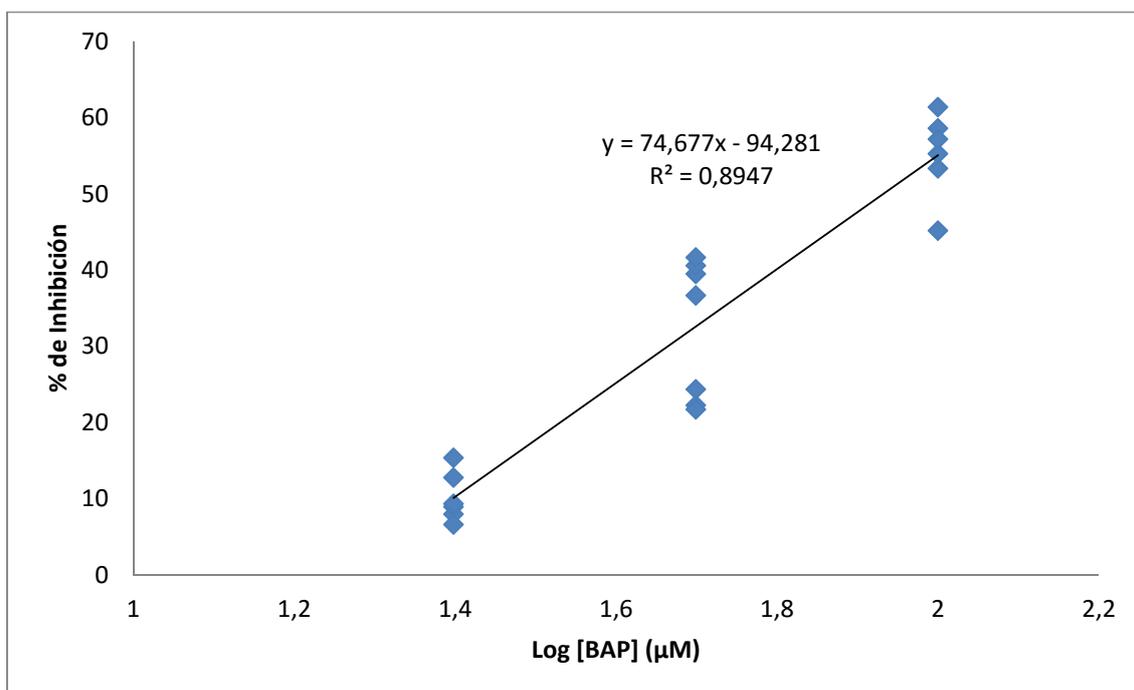


Fig. 14: Representación gráfica de la recta de regresión para el cálculo de la ED_{50} de la BAP sobre *B. cinerea*.

4.3.2. Efecto de la metionina sobre sobre la actividad fungicida de la BAP

La L-metionina (MET) no pareció afectar al efecto fungicida de la BAP (Fig. 15). Tras la realización del test ANOVA, se determinó que sí existían diferencias significativas entre los tratamientos con un p-valor de $3,102 \times 10^{-7}$. Con el objetivo de determinar a qué tratamientos se les asignan esas diferencias, se realizó un test de Tukey y se observaron

diferencias significativas entre el control y la BAP (p -valor $<0,001$), entre el control y la BAP+MET (p -valor $<0,001$), entre la BAP y la MET (p -valor $<0,001$) y entre la MET y la BAP+MET (p -valor $<0,001$) (Fig. 16). En definitiva, la adición de metionina al medio no palía el efecto fungicida de la BAP.

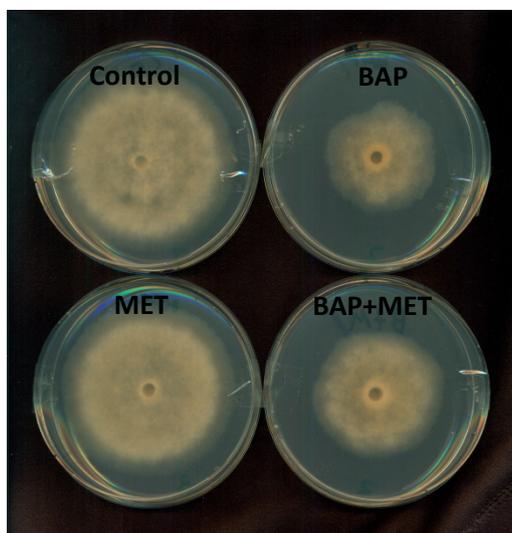


Fig. 15: Crecimiento de *B. cinerea* en presencia de BAP y/o metionina. Izquierda arriba: control; derecha arriba: tratamiento con BAP; izquierda abajo: tratamiento con metionina; derecha abajo: tratamiento con BAP más metionina.

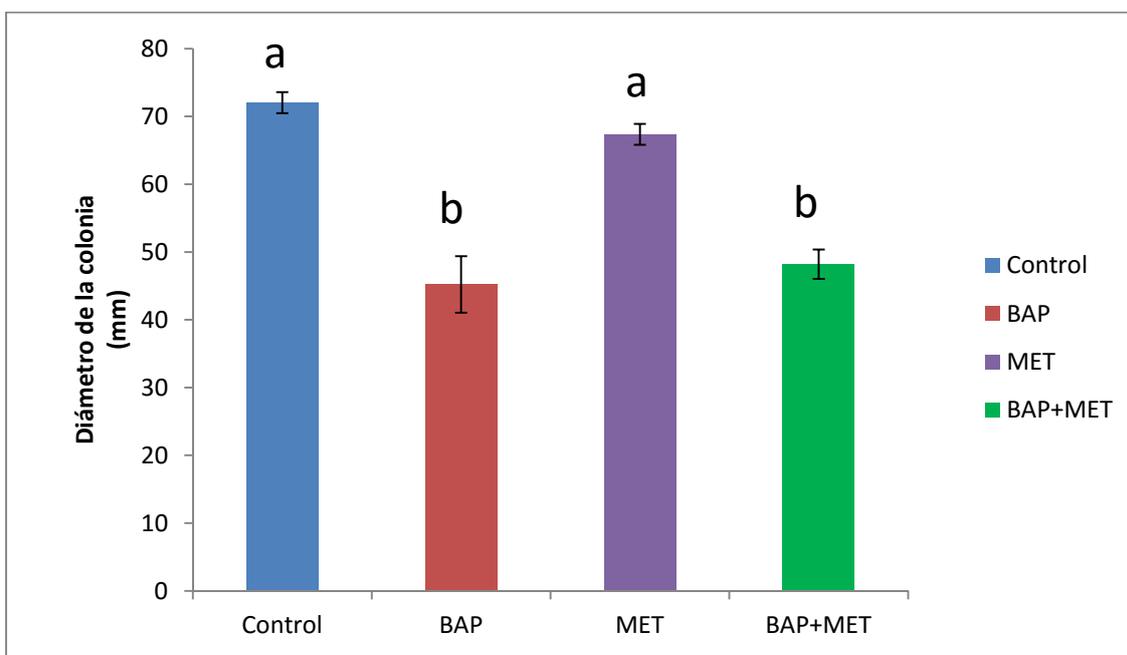


Fig. 16: Efecto de la metionina (MET) sobre la actividad fungicida de la BAP sobre *B. cinerea*. Los datos son la media \pm el error estándar de 6 cultivos por tratamiento correspondientes a dos experimentos independientes. Las diferentes letras indican la presencia de diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

5. DISCUSIÓN.

En lo referente a los ensayos de severidad, en ciertos trabajos como el de Pardiño (2016), se había comprobado que la aplicación exógena de BAP producía protección a nivel sistémico y local en *Phaseolus vulgaris* frente a la infección de *Phytophthora capsici*. En otros como el de Rey (2016) se comprobó que aunque la aplicación de etileno no era capaz de proteger a *Zinnia elegans* frente a la infección por *Botrytis cinerea*, la aplicación de BAP sí lo conseguía. En otros como el de Nafisi *et al.* (2015) se ve que se incrementaba la resistencia frente a *Botrytis cinerea* en tomates transgénicos que tenían mayores niveles de citoquininas. También Mishra *et al.* (2009) concluyen que la BAP tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la enfermedad en taro (*Colocasia esculenta*), reduciendo la severidad de la misma a medida que se incrementa la concentración de BAP. Por lo que en el presente estudio se reafirma la capacidad de la BAP de conferir protección frente a determinados hongos. Esta protección podría deberse a una inducción de la resistencia, que podría tener diferentes explicaciones entre las que se incluye la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de antioxidantes (Brenner *et al.* 2012).

En el estudio de Díaz *et al.* (2002) se vio que plantas pretratadas con etileno mostraban un descenso en la susceptibilidad del tomate (*Lycopersicon esculentum*) frente a *B. cinerea* y se observó también que el mutante *Defenseless* deficiente en la biosíntesis de jasmonato, mostraba un incremento en la susceptibilidad al hongo. Esto puede estar relacionado con lo comentado previamente (Naseem & Dandekar, 2012) de que la ruta del SA proporcionaba resistencia a las plantas frente a patógenos biotrofos (desencadenando la SAR (Veloso *et al.*, 2014)) mientras que la ruta del JA/ET proporcionaba frente a patógenos necrotrofos, incluido *Botrytis*. La regulación hormonal del sistema inmune de las plantas es clave para activar las respuestas adecuadas frente a cada patógeno y poder así contrarrestar de manera efectiva el ataque del patógeno (Pieterse *et al.*, 2012). Por lo tanto, la posible resistencia inducida por la aplicación exógena de BAP podría estar relacionada con una activación de la ruta del jasmonato y etileno, pues afectaría principalmente a los hongos necrotrofos como el usado en este estudio. Sin embargo, como se dijo en la introducción, las citoquininas parecen favorecer la ruta del SA (Naseem & Dandekar, 2012). Otros autores han encontrado que el SA también puede conferir resistencia a *B. cinerea* en algunas especies (Díaz *et al.*, 2002; Vicedo *et al.*, 2009).

En el presente trabajo también se ha observado que los niveles de actividad peroxidasa eran significativamente mayores cuando se añadía exógenamente BAP y cuando se inoculaba con *Botrytis*. En trabajos previos (Rey, 2016) se comprobó que la aplicación exógena de BAP no inducía cambios en los niveles de proteínas relacionadas con la defensa de *Zinnia elegans* (como la peroxidasa, la quitinasa o la β -1,3 glucanasa), lo que podría explicar el porqué de la ausencia de diferencias significativas entre el control y el tratamiento con BAP no inoculado. Además, en el mismo trabajo se vio que los niveles de expresión del gen *ZePRX* que codifica para la peroxidasa sí se incrementaban significativamente, por lo que sugiere que la inoculación de *Botrytis*, sumado a la aplicación de BAP, desencadena un mecanismo de respuesta en las plantas (en nuestro caso, *Phaseolus vulgaris*) relacionado con un incremento de los

niveles de la enzima peroxidasa. La peroxidasa está presente en un amplio rango de procesos fisiológicos de la planta (Almagro *et al.*, 2008), que incluyen: metabolismo de la auxina, formación de lignina y suberina, síntesis de fitoalexinas, unión de los componentes de la pared celular y metabolismo de ROS. La formación de lignina y la síntesis de fitoalexinas están relacionados con la resistencia de la planta a los patógenos.

Como se ha comentado en apartados anteriores, el efecto fungicida de la BAP sobre *B. cinerea* se había comprobado en trabajos previos a este (Rey, 2016) por lo que uno de los objetivos del presente estudio era el cálculo de la ED₅₀ de la BAP como fungicida. Diferentes autores han calculado las ED₅₀ de diferentes sustancias utilizadas para el control de *Botrytis cinerea* en los campos de cultivo. Moyano *et al.* (2004) obtienen una ED₅₀ para el pirimetanil de 0,05-0,5 mg/l para aislados sensibles, mientras que obtiene una ED₅₀ de esa misma sustancia de 1-10 mg/l en los aislados resistentes. Petsikos-Panayotarou *et al.* (2003) afirman que el pirimetanil retrasa la aparición de la enfermedad pero que no reduce la tasa de infección, obteniendo unas ED₅₀ de un rango de valores entre 0,03 y 0,19 µg/ml para esta sustancia. Mientras que obtienen una ED₅₀ de 0,006-0,054 µg/ml para el ciprodinil. De esta manera podemos apreciar que las ED₅₀ calculadas para fungicidas comerciales, como son el pirimetanil y el ciprodinil, son inferiores a la obtenida en este trabajo para la BAP (85,52 µM, que es equivalente a 19,26 mg/l). Es decir, que se necesitaría una mayor dosis de BAP que de pirimetanil para tratar a las plantas frente a *B. cinerea*. Estas diferencias en escalas podrían deberse fundamentalmente a que el aislado del hongo utilizado en este estudio es una cepa de laboratorio (B0510), mientras que en los trabajos revisados eran aislados de campo. Sería necesario calcular la ED₅₀ del pirimetanil en el aislado B0510 para establecer una comparación más adecuada.

Masner *et al.* (1994) observaron que al añadir L-metionina al medio en el que crece *Botrytis cinerea*, la inhibición del crecimiento provocada por un fungicida comercial, como es el pirimetanil era menor, por lo que se dedujo que el mecanismo de acción de este podría ser la inhibición de la síntesis del aminoácido. Esta afirmación todavía no está completamente demostrada pues aún no se han aislado los genes para determinar que efectivamente esa es la diana de actuación del pirimetanil.

Rey (2016) observó que los efectos del pirimetanil y la BAP sobre el crecimiento de *B. cinerea* no eran aditivos. Por ello, en el presente trabajo se trató de comprobar si la adición de L-metionina paliaba el efecto fungicida de la BAP. Los resultados obtenidos en esta investigación, no sugieren que el mecanismo de acción de la BAP como fungicida sea la misma que la del pirimetanil, pues la adición de L-metionina al medio en el que ya existía la presencia de BAP, no reduce significativamente el efecto de la misma. Por lo tanto, podría ser interesante la investigación de las dianas de actuación de la BAP como fungicida en estudios posteriores.

Para el control de la podredumbre gris en *Vitis vinífera* en un viñedo de Chile, se usaba un fungicida del grupo de la aminopirimidina, el ciprodinil. Y se vio (Latorre *et al.*, 2002) que su aplicación solo y por más de cuatro veces al año, generaba cepas del hongo resistentes, produciendo además una resistencia cruzada a otros fungicidas como el mepanipirim y el pirimetanil. Los campos de cultivos de fresa de Alemania también se solían tratar con fungicidas para evitar las infecciones de *Botrytis* (Leroch *et al.*, 2013) y

se ha observado resistencia a los mismos. El desarrollo de tales resistencias por parte de hongos, hace que sean necesarias nuevas líneas de investigación en el campo de los productos fitosanitarios, como la investigación de la aplicación de BAP con función de protección.

La comercialización de productos fitosanitarios en agricultura está muy controlada y regulada pues hay que asegurar la protección de medio ambiente y de la salud humana. Es decir, que introducir un fungicida nuevo en el mercado es altamente costoso y debe pasar por estrictos controles de salud.

La 6-bencilaminopurina está registrada y aprobada en la Unión Europea como producto fitosanitario fitorregulador (Rey, 2016) desde el año 2011, por lo que realizando más experimentación sobre los efectos de este producto como fungicida, se podría comercializar más fácilmente que otras sustancias químicas nuevas.

6. CONCLUSIONES

Castellano:

- 1) La aplicación exógena de BAP en la superficie de las hojas de *Phaseolus vulgaris* provoca una reducción significativa en el área de la lesión producida, confiriendo protección a la planta frente a *B. cinerea*.
- 2) La aplicación exógena de BAP, sumada a la presencia del hongo, produce un incremento en la actividad peroxidasa, lo que sugiere un efecto de resistencia inducida.
- 3) La ED₅₀ calculada para la BAP es: 85,52 µM. Y se ha comprobado que el modo de acción de la BAP como fungicida no es la inhibición de la síntesis de metionina del hongo.

Inglés:

- 1) Exogenous application of BAP on the surface of the leaves of *Phaseolus vulgaris* causes a significant reduction in the area of the lesion produced, giving protection to the plant against *B. cinerea*.
- 2) Exogenous application of BAP, added to presence of the fungus, causes an increase in peroxidase activity, suggesting an effect of induced resistance.
- 3) The ED₅₀ calculated for BAP is: 85.52 µM. And it was found that the mode of action of BAP as a fungicide is not the inhibition of methionine synthesis of the fungus.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., & Pedreño, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, *60*, 377–390.
- Brenner, W.G., Ramireddy, E., Heyl, A., Schmulling, T., 2012. Gene regulation by cytokinin in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*. *3*, 8.
- 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. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 155.
- Díaz, J., Have, A. ., & van Kan, J. A. L. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, *129*, 1341–1351.
- Grosskinsky, D. K., Naseem, M., Abdelmohsen, U. R., Plickert, N., Engelke, T., Griebel, T., ... Roitsch, T. (2011). Cytokinins mediate resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signaling. *Plant Physiology*, *157*, 815–30.
- Hoagland, D. & Arnon, D. (1950). *The water-culture method for growing plants without soil*. Berkeley (California): College of Agriculture, University of California.
- Latorre, B. A., Spadaro, I., & Rioja, M. E. (2002). Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*, *21*, 957–961.
- Leroch, M., Plesken, C., Weber, R. W. S., Kauff, F., Scalliet, G., & Hahn, M. (2013). Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*, 159–167.
- Manfredini, C., Sicilia, F., Ferrari, S., Pontiggia, D., Salvi, G., Caprari, C., ... Lorenzo, G. De. (2006). Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *67*, 108–115.
- 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. (2009). Effect of benzyl amino purine on the pathogen growth and disease development of taro leaf blight caused by *Phytophthora colocasiae*. *Journal of Plant Pathology*, *90*, 191–196.
- Moyano, C., Gómez, V., & Melgarejo, P. (2004). Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *Journal of Phytopathology*, *152*, 484–490.
- 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 Pathogens*, *8*, 11.
- Pardiño, C. (2016). Regulación da resistencia a *Phytophthora capsici* por citocininas en feixón. Trabajo fin de grado. Facultad de Ciencias. Universidad de A Coruña.
- Petsikos-Panayotrou, N., Markellou, E., Kalamarakis, A. E., Kyriakopoulou, D., & Malathrakis, N. E. (2003). In vitro and in vivo activity of cyprodinil and pyrimethanil on *Botrytis cinerea* isolates resistant to other botryticides and selection for resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. *European Journal of Plant Pathology*, *109*, 173–182.

- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489–521.
- Rey, C. (2016). Ensayo del etileno y de una citoquinina como posibles fitosanitarios frente a *Botrytis cinerea* en la planta ornamental *Zinnia elegans*. Trabajo fin de máster. Facultad de Ciencias. Universidad de A Coruña.
- Smith, A., Coupland, G., Dolan, L., Harberd, N., Jones, J., Martin, C., Sablowski, R. & Amey, A. (2010). *Plant biology*. Garland Science.
- 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. *European Journal of Plant Pathology*, 120, 289–297.
- Taiz, L. & Ziegler, E. (2015). *Plant physiology and development*, 6th edition. Sinauer Associates.
- van Kan, J. A. L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11, 247–253.
- Veloso, J., García, T., Bernal, A., & Díaz, J. (2014). New bricks on the wall of induced resistance: Salicylic acid receptors and transgenerational priming. *European Journal of Plant Pathology*, 138, 685–693.
- Vicedo, B., Flors, V., de la O Leyva, M., Finiti, I., Kravchuk, Z., Real, M. D., ... González-Bosch, C. (2009). Hexanoic acid-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 1455–1465.
- 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.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 561–580.