



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

## **MEMORIA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**Regulación da resistencia do pemento fronte a *Botrytis cinerea* por  
bencilaminopurina e ácido abscísico**

**Regulación de la resistencia del pimiento frente a *Botrytis cinerea* por  
bencilaminopurina y ácido abscísico**

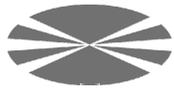
**Regulation of pepper resistance against *Botrytis cinerea* by  
benzylaminopurine and abscisic acid**



**Adrián Lestayo Rey**

**Septiembre 2017**

**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, CONTRATADO POSDOUTORAL, DOUTOR EN BIOLOXÍA, DO DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA DA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que o presente Traballo de Fin de Grado presentado polo alumno ADRIAN LESTAYO REY e titulado

“Regulación da resistencia do pemento fronte a *Botrytis cinerea* por bencilaminopurina e ácido abscísico”

“Regulación de la resistencia del pimiento frente a *Botrytis cinerea* por bencilaminopurina y ácido abscísico”

“Regulation of pepper resistance against *Botrytis cinerea* by benzylaminopurine and abscisic acid”

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 11 de Setembro de 2017.

**DIAZ  
VARELA  
JOSE -  
32782379L**  
Asdo. José Díaz Varela

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: 2017.09.11 17:51:52  
+02'00'

**VELOSO  
FREIRE  
JAVIER -  
44836782F**  
Asdo. Javier Veloso Freire

Digitally signed by VELOSO FREIRE  
JAVIER - 44836782F  
DN: c=ES,  
serialNumber=44836782F,  
sn=VELOSO FREIRE,  
givenName=JAVIER, cn=VELOSO  
FREIRE JAVIER - 44836782F  
Date: 2017.09.11 17:48:49 +02'00'

## ÍNDICE

RESUMEN .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. <i>Capsicum annuum</i> L. (Cv. Padrón). .....	4
1.2. El hongo, <i>Botrytis cinerea</i> . .....	5
1.3. La resistencia inducida por factores abióticos y bióticos. ....	8
1.4. Hormonas y resistencia a patógenos.....	9
1.4.1. Citoquininas y ácido abscísico en la resistencia a patógenos. ....	10
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	12
3.1. Material vegetal. ....	12
3.2. Material fúngico.....	12
3.3. Tratamiento con hormonas. ....	12
3.4. Inoculación y medida de síntomas.....	13
3.5. Determinación de fenoles solubles totales.....	13
3.6. Análisis estadístico. ....	14
4. RESULTADOS .....	15
4.1. Efecto de ABA y BAP sobre los síntomas de <i>B. cinerea</i> . ....	15
4.2. Efecto de BAP y ABA sobre el contenido en fenoles. ....	15
5. DISCUSIÓN.....	17
6. CONCLUSIONES.....	19
7. BIBLIOGRAFÍA.....	20

## RESUMEN

*Botrytis cinerea* es un hongo necrotrofo que afecta a una gran variedad de plantas, de diferentes formas y con una gran plasticidad génica, lo cual hace complicado el control de este patógeno. Una de las plantas a las que afecta es *Capsicum annuum*, una especie cultivada en todo el mundo y con gran importancia en el aspecto económico. Este trabajo trata de comprobar si aplicando exógenamente bencilaminopurina y ácido ábscisico se produce una reducción en los síntomas producidos por *B. cinerea*, y si estos tratamientos alteran la concentración de fenoles en la planta, los cuales están relacionados con la defensa de la planta. Los resultados mostraron cómo la bencilaminopurina producía una reducción significativa del área de lesión provocada por el patógeno, mientras que cuando se aplican juntas las dos fitohormonas, producen un efecto antagónico en la reducción de los síntomas. Además, ninguno de los tratamientos mostró diferencias significativas en la concentración de fenoles con respecto al control. Para concluir, podemos decir que la bencilaminopurina tiene un efecto de reducción de síntomas pero, al igual que el ácido abscísico, no altera la concentración de fenoles.

## RESUMO

*Botrytis cinerea* é un fungo necrotrofo que afecta a unha gran variedade de plantas, de diferentes formas e cunha gran plasticidade xénica, o cal fai complicado o control deste patóxeno. Unha das plantas ás que afecta é *Capsicum annuum*, unha especie cultivada en todo o mundo e cunha gran importancia no aspecto económico. Este traballo trata de comprobar se aplicando esoxenamente bencilaminopurina e ácido ábscisico prodúcese unha redución dos síntomas producidos por *B. cinerea*, e se estes tratamentos alteran a concentración de fenóis na planta. Os resultados mostraron como a bencilaminopurina producía unha redución significativa da área de lesión provocada polo patóxeno, mentres que cando se aplican xuntas as dúas fitohormonas, producen un efecto antagónico na redución dos síntomas. Ademais, ningún dos tratamentos mostrou diferenzas significativas na concentración de fenóis con respecto ao control. Para concluír, podemos dicir que a bencilaminopurina ten un efecto de redución dos síntomas pero, ao igual que o ácido abscísico, non altera a concentración dos fenóis.

## ABSTRACT

*Botrytis cinerea* is a necrotrophic fungus that affects a wide range of plant species in different ways and possesses a great genetic plasticity, which makes difficult the control of this pathogen. One plant species affected by this pathogen is *Capsicum annuum*, a species cultivated all over the world and with a great economic importance. This work assays the exogenous effect of benzylaminopurine and abscisic acid on the development of disease symptoms produced by *B. cinerea*, and whether these treatments alter the concentration of phenols in the plants. The results showed that benzylaminopurine produced a significant reduction in the area of the lesions caused produced by the pathogen, while when the two phytohormones are applied together, they produce an antagonistic effect on the reduction of the symptoms. In addition, none of the treatments showed significant differences with the control on the concentration of total soluble phenols. To conclude, we can say that benzylaminopurine decreases the Botrytis-infected area but, similar to abscisic acid, it does not make significant changes in the amount of total soluble phenols.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Capsicum annuum* L. (Cv. Padrón).

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es una planta de gran importancia en múltiples campos, desde la agricultura a la cocina, pasando por su interés en materia medicinal. Los pimientos se cultivan en todo el mundo y han ido ganando importancia progresivamente, lo cual ha llevado a que su producción aumente cada vez más.

Su clasificación taxonómica es la siguiente: Reino: Plantae; Phylum: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida ;Subclase: Asteridae Orden: Solanales; Familia: Solanaceae; Genero: *Capsicum*; Especie: *Capsicum annuum* L.

El género *Capsicum* engloba todos los pimientos, chiles o ajís, y su nombre científico proviene del griego, pero existen distintas teorías sobre su origen etimológico. Algunos autores señalan que procede de la palabra *kapso*, que significa “picar”, mientras que para otros vendría de *kapsakes*, que quiere decir “cápsula” (Nuez *et al.*, 1996).

Este género proviene de América y, dentro de él, la especie *annuum* destaca por estar vinculada a ambientes más húmedos que las demás y por presentar flores blancas (Nuez *et al.*, 1996).



Figura 1. *Capsicum annuum* L. Tomado de: [http://blog.clementeviven.com/?page\\_id=178](http://blog.clementeviven.com/?page_id=178)

El fruto de esta planta es especialmente relevante por estar presente en la cocina de la mayoría de los países del mundo, en los cuales puede ser consumida bien fresco, bien como encurtido, seco, asado o cocinado de múltiples formas, pasando por su ingesta en polvo o como salsa. Otro uso común de la especie *annuum* es el de la conserva de alimentos, como sucede, por ejemplo,

en algunas comarcas españolas, donde los jamones y cecinas se preparan cubriéndolos con pimentón (Nuez *et al.*, 1996).

Esta planta es un estimulante digestivo que contiene las vitaminas A, C, B1, B2, y P, lo cual le otorga interés nutricional y explica que, a lo largo de la historia, fuese utilizada con fines medicinales, algo que siguen poniendo en práctica algunos pueblos americanos (Nuez *et al.*, 1996).

Sin embargo, el interés de esta especie no se limita al campo de la nutrición sino que, en el caso de España, se extiende al nivel económico. Esto se debe a que, dentro de la Unión Europea, nuestro país destaca en la producción de esta planta, no tanto por la superficie cultivada de la misma, como por superar al resto de Europa en un 284% (Nuez *et al.*, 1996). La evolución de su producción y de la superficie cultivada en España entre 1994 y 2014 pueden observarse en la Figura 2.

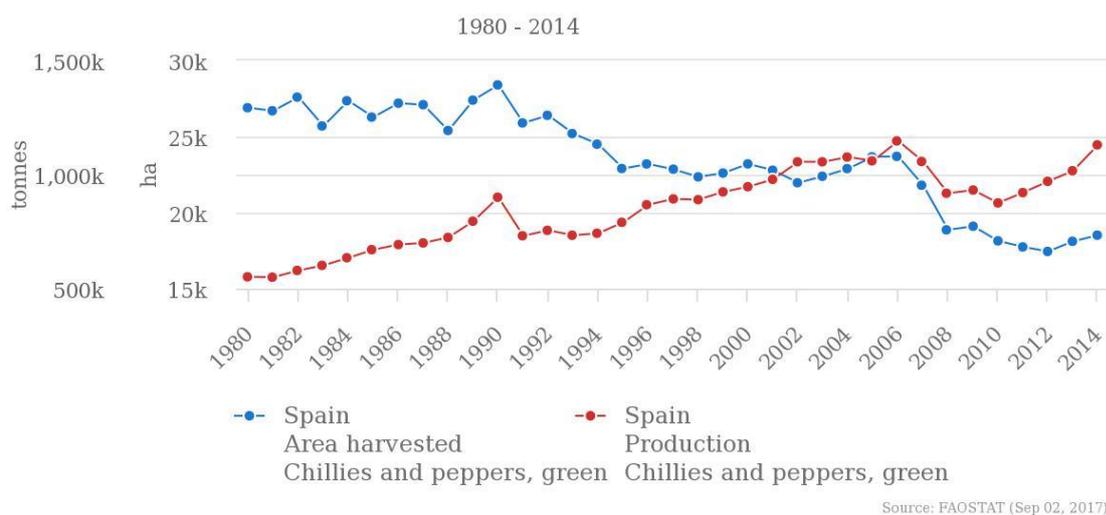


Figura 2. Evolución de la superficie cultivada y producción de pimientos en España. Fuente: FAOSTAT

## 1.2. El hongo, *Botrytis cinerea*.

*B. cinerea* es un hongo necrótrofo (Figura 3) muy estudiado por la comunidad científica dadas sus características patógenas, que suponen una gran dificultad tanto para controlarlo cuando ataca a los cultivos, como para evitar la infección de los mismos.

Su clasificación taxonómica es la siguiente: Reino: Fungi; Phylum: Ascomycota; Subphylum: Pezizomycotina; Clase: Letiomycetes; Orden: Helotiales; Familia: Sclerotiniaceae; Genero:

*Botrytis*; Especie: *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. o *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (en su forma perfecta).

*Botrytis cinerea* produce una infección con una amplia gama de síntomas, que van desde las pudriciones blandas y la rápida aparición de masas de conidios grises, hasta el colapso y erosión de los tejidos del parénquima, siendo estos algunos de sus efectos más comunes.

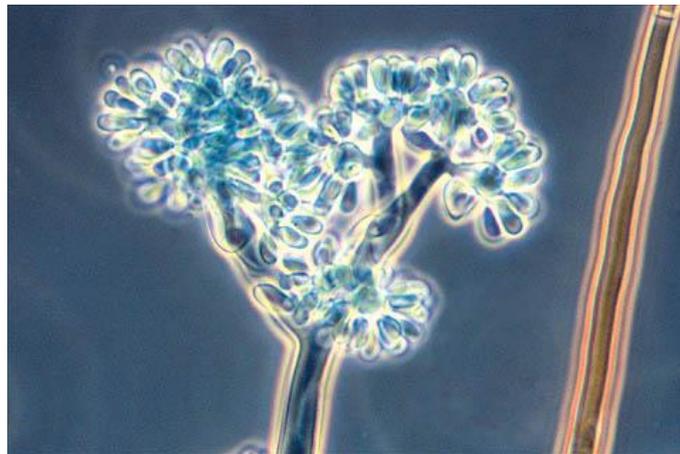


Figura 3. Hifa y conidios de *Botrytis cinerea* Tomado de: <http://www.apsnet.org/publications/imageresources/Pages/bean052.aspx>

Otra de sus características más notables es el gran rango de especies a las que puede afectar, que supera las 200, lo cual provoca grandes pérdidas en cultivos de todo el mundo (Williamson, 2007). Asimismo, dicho rango no es amplio solo en lo que a las especies se refiere, sino que también se refleja en el espectro de órganos a los que puede atacar: flores (figura 4), frutos (Figura 5), hojas (figura 6) y hasta raíces y órganos de reserva (Droby y Lichter, 2004). Se ha observado que en función de la especie hospedadora, el hongo tiene una mayor afinidad para atacar a unos u otros órganos (Shafia, 2009).



Figura 4. Infección de Botrytis en flores. Tomado de: <http://www.cyclamen.com/es/profesional/enfermedades/8/20>



Figura 5. Infección en frutos. Tomado de: <http://infoagro.com/mexico/podredumbre-gris-en-frutillas-botrytis-cinerea/>



Figura 6. Infección de Botrytis en hojas de tabaco. Tomado de: <http://ephytia.inra.fr/en/C/10963/Tobacco-Botrytis-cinerea>

Siguiendo con la enumeración de las características que dificultan la eliminación y el control del patógeno, cabe destacar la multiplicidad de formas que tiene de atacar a su hospedador. Un ejemplo sería la generación de un gran espectro de metabolitos fitotóxicos de bajo peso molecular. También puede provocar un estallido oxidativo en las células de la planta afectada (Tenberge, 2004). Otra posible forma de ataque sería la generación de ácido oxálico (Germeier *et al.*, 1994) y toxinas. Una característica fundamental de su método de ataque es la existencia de un patrón: no emplea “toxinas básicas” las cuales provocarían la desorganización dentro de la célula provocando la necrosis dentro de esta, las sustancias tóxicas que utiliza *B. cinerea* no provocan la muerte de las células afectadas de forma directa, sino que necesitan que exista una participación activa por parte del hospedador, es decir, estas sustancias provocan en el hospedador fenómenos similares a PCD (muerte celular programada) (van Kan, 2006).

Por último, otra de las características de *B. cinerea* que dificulta su control es la capacidad del patógeno para colonizar plantas sin causar daños. Esto quiere decir que en un cultivo podría haber plantas afectadas que no mostrasen síntomas aparentes, impidiendo así su tratamiento y permitiendo a *B. cinerea* comenzar el ataque dentro de su hospedador bajo condiciones favorables, siguiendo la estrategia del caballo de Troya (van Kan, 2014).

En cuanto al control de los hongos patógenos, tradicionalmente se han usado muchos pesticidas pero cada vez van surgiendo más cepas resistentes generando graves problemas, *B. cinerea* es un buen ejemplo de este problema, dada su gran plasticidad genotípica (Elad *et al.*, 2016).

Una alternativa de control de este patógeno, podría ser la resistencia inducida.

### **1.3. La resistencia inducida por factores abióticos y bióticos.**

El tratamiento de plantas mediante agentes, ya sean bióticos o abióticos, puede provocar cambios en las mismas que les confieran resistencia a ciertos patógenos (Walters *et al.*, 2013). Existe un amplio espectro de agentes con la capacidad de inducir resistencia (da Rocha y Hammerschmidt, 2005; Lyon, 2007). Entre las sustancias abióticas cabe destacar el acibenzolar S-metil (ASM), el ácido  $\beta$ -aminobutírico, el probenazol o la sacarina, mientras que entre los factores bióticos podemos señalar, por ejemplo, los hongos micorrícicos o extractos de algas, (Walters *et al.*, 2013).

El efecto de estos agentes depende de muchas variables; por ejemplo, diferencias genotípicas entre las plantas a la que se apliquen, que afectarán a la expresión de la resistencia inducida (Resende *et al.*, 2002). De hecho, Walters *et al.*, (2011) demostraron que aplicando los mismos agentes, las respuestas fluctúan incluso dentro de las variedades de una misma especie vegetal.

Otro factor que puede variar los resultados es la edad de la planta tratada, puesto que la respuesta de resistencia puede ser mayor o menor en hojas de diferentes edades (Cohen y Gisi,1994).

También es importante tener en cuenta el lugar en el que se aplican los agentes responsables de inducir resistencia en la planta, ya que sus efectos no son iguales al aplicarse en hojas que en raíces u otros órganos. Prueba de ello son, por ejemplo, los experimentos realizados por Worrall *et al.* (2012), que demostraron que aplicando diferentes agentes a las semillas de tomate, se inducía una mayor resistencia al patógeno estudiado que aplicándolos en otros estadios de desarrollo de la planta.

#### **1.4. Hormonas y resistencia a patógenos.**

La respuesta inmune de las plantas está regulada por las fitohormonas. Existen dos fitohormonas fundamentales para la inmunidad vegetal, el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmonico (JA) (Browse, 2009; Vlot *et al.*, 2009). Estas dos fitohormonas regulan procesos de defensa diferentes, el SA regula la defensa frente a patógenos biotrofos mientras que el JA regula la defensa frente a patógenos necrotrofos (Glazebrook, 2005).

Sin embargo, a la hora de hablar de resistencia inducida, es fundamental tener en cuenta el papel combinado de ambas fitohormonas. La regulación de las defensas de la planta tratada no se logra mediante la activación aislada de cada vía hormonal, sino a través de una red compleja que regula y conecta las diferentes vías, permitiendo así que cada una de ellas facilite o antagonice a la otra. De este modo, se logra afinar la respuesta de defensa al patógeno individual (Adie *et al.*, 2007).

Otra hormona que ha demostrado su importancia a este respecto es el etileno (ET), que ha demostrado servir como regulador en la interaccion entre JA y SA. El ET es una hormona muy importante que regula tanto procesos de desarrollo como de estrés abiótico, así como de relaciones planta-patógeno (Boller, 1991; Bleecker y Kende 2000) siendo así un modulador

importante en la respuesta inmune de las plantas (Broekaert *et al.*, 2006). Numerosos estudios demuestran la importancia del papel del ET en los procesos de “*cross-talk*” entre esta hormona y los procesos de señalización del JA y el SA. La interacción SA-JA durante los ataques de patógenos puede estar mediada por el ET, que está presente en la zona donde se produce el ataque (Pieterse *et al.*, 2012).

Además de SA, JA y ET, hay otras hormonas que participan en la resistencia a los patógenos, por ejemplo las citoquininas y el ácido abscísico.

#### **1.4.1. Citoquininas y ácido abscísico en la resistencia a patógenos.**

El ácido abscísico (ABA) es una hormona que juega importantes roles en la regulación de las respuestas a la sequía, el estrés por bajas temperaturas y el estrés osmótico (Nafisi *et al.*, 2015). También se ha estudiado su función en la defensa de la planta ante patógenos, como ocurre, por ejemplo, en los experimentos de Adie *et al.* (2007), cuyos resultados indican que el ABA es un componente de la red de señalización con la función de activar las defensas de la planta para la resistencia frente a algunos patógenos necrotróficos, y que puede mejorar dichas defensas mediante dos vías independientes: afectando a la síntesis de calosa y a la de JA. El papel diferencial de la hormona dentro de las distintas interacciones planta-patógeno sugiere que los niveles de ABA pueden ser claves para el ajuste preciso de las defensas de la planta contra patógenos particulares, un sistema de modulación previamente sugerido para ET (Pierik *et al.*, 2006).

Por último, cabe mencionar el papel en la defensa de la planta de las citoquininas en general, y de la 6-bencilaminopurina (BAP) en particular, que ha sido la empleada en este trabajo. Las citoquininas son hormonas de crecimiento cuya función como moduladores de la inmunidad de las plantas también ha sido estudiada (Choi *et al.*, 2011; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Estas suelen estar relacionadas con la respuesta de una planta ante los patógenos biotróficos que alteran la fisiología del huésped. A este respecto, Walters y McRoberts (2006) y Choi *et al.* (2010) demostraron que las citoquininas modulan la señalización del SA y que, por lo tanto, pueden actuar sinérgicamente con esta hormona dentro de la red global de señalización de la respuesta inmune de las plantas.

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1. Observar si aplicando exógenamente BAP y ABA a *Capsicum annuum* se consigue resistencia a *Botrytis cinerea*.
2. Comprobar si hay cambios en los niveles de fenoles de las plantas tras aplicar los tratamientos con BAP y ABA, ya que aquellos son compuestos relacionados con la defensa de la planta.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material vegetal.**

Para este experimento se utilizó como material vegetal plantas de pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L. cv. Padrón). El proceso de obtención de las plantas comenzó sembrando aproximadamente 1g de semillas en vermiculita, con un riego con solución nutritiva de Hoagland y Arnon (1950). Después de dos semanas, las plántulas fueron trasplantadas a una mezcla de tierra vegetal y vermiculita en proporción 3:1 (v/v). Las plantas se mantuvieron en una cámara con un fotoperiodo de 16 horas de luz a 25°C y 8 horas restantes de oscuridad a 18°C, con riego periódico con agua del grifo. Diez días después de ser trasplantadas, las plantas fueron tratadas con las hormonas.

#### **3.2. Material fúngico.**

Para el material fúngico se usó el aislado B0510 de *Botrytis cinerea*, cultivado en medio PDA (Patata Dextrosa Agar). Se repicó en PDA seis días antes de inocular las plantas de pimiento con el hongo. El aislado fue proporcionado por el Dr. Jan Van Kan (WUR, Países Bajos)

#### **3.3. Tratamiento con hormonas.**

Cuando las plantas crecieron lo suficiente, y un día antes de ser inoculadas, fueron divididas en cuatro grupos, a los cuales se les aplicaron diferentes tratamientos: El control, en el cual se añadió sólo dimetilsulfóxido (DMSO) 0,02%; ABA, en el cual se aplicó DMSO 0,02% v/v y ABA a 50µM; BAP, al cual se incorporó DMSO 0,02% y BAP a 50µM; y, finalmente, ABA+BAP, al que se añadió ABA y BAP a las mismas concentraciones mencionadas.

Estas soluciones, fueron aplicadas sobre el primer par de hojas verdaderas empleando un pulverizador, en una cantidad de 10 ml por planta.

### **3.4. Inoculación y medida de síntomas.**

Tras la incubación del hongo durante 6 días, se tomaron de la placa de PDA discos de 5mm de diámetro que contenían el hongo en fase de crecimiento. Dichos discos se inocularon sobre las plantas, aplicando dos por hoja en cada una de las hojas tratadas, que serían las dos primeras hojas verdaderas.

Tras los procesos de inoculación se incubaron las plantas durante 48 horas en cajas con una capa de agua en el fondo con el objetivo de generar humedad, dando lugar así a unas condiciones favorables para el crecimiento del hongo. Tras estas 48 horas se tomaron las plantas y con un calibre se midió el diámetro de las lesiones. A partir de los diámetros se calcularon las áreas de las lesiones.

Se realizaron dos experimentos independientes, con cinco plantas por tratamiento y experimento.

### **3.5. Determinación de fenoles solubles totales.**

Para esta determinación, se realizaron tres experimentos independientes. Se tomaron las dos hojas tratadas de las plantas 24 horas después del proceso de inducción, se pesaron las hojas por grupos (Control, ABA, BAP y ABA+BAP) y se congelaron a -20°C hasta el momento de ser analizadas.

Para hacer la determinación de los fenoles, se homogeneizaron las hojas y en un mortero junto con 5 ml de metanol al 80%. Después, se vertió el extracto en un tubo con tapón de rosca, que se incubó a 70°C durante 15 minutos y luego se centrifugó a 1500xg durante 10 minutos. A continuación, se recogió el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en otros 5 ml de metanol al 80%. De nuevo, se centrifugó y se recogió el sobrenadante en el mismo tubo, el cual se enrasó a 10 ml utilizando metanol al 80%.

El siguiente paso consistió en preparar el blanco y los tubos de medida. En el blanco se echaron 50 µl de metanol al 80%, y en las muestras, 50 µl de cada muestra. Después se añadieron 750 µl de agua destilada a todos los tubos y, a continuación, 50 µl de Reactivo de Folin-Ciocalteu. Se agitó cada tubo y se incubó durante 3 minutos en temperatura ambiente. Tras esto, se añadieron 150 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%, se volvieron a agitar los tubos y se dejaron incubar durante

2 horas. Para terminar, usando el blanco para ajustar la absorbancia a 0, se midió la absorbancia de los otros tubos a 760 nm.

Los datos de absorbancia se llevaron a una recta de calibrado realizada con ácido gálico (un ácido fenólico) para calcular la concentración de los compuestos fenólicos.

### **3.6. Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVII. Se realizó un test de Kruskal-Wallis con un nivel de significación del 95%, (se utilizó este test ya que el conjunto de datos no presentaba una distribución normal). Esto permitió determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes datos de áreas de lesión y fenoles solubles totales en los distintos tratamientos. También se utilizó un test de Bonferroni para observar entre qué grupos de los diferentes tratamientos existían diferencias significativas en los rangos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efecto de ABA y BAP sobre los síntomas de *B. cinerea*.

Para analizar los resultados, se tomaron los datos y se realizó un tests de Kruskal-Wallis, en este caso, para ver si había diferencias significativas del área de lesión a las 48 horas entre los diferentes tratamientos. Se obtuvo un p-valor de 0,0042 menor que 0,05 y por lo tanto con diferencias significativas. Tras este test, se realizó un test de Bonferroni para ver entre qué tratamientos existían estas diferencias significativas, que se dieron entre el control y las plantas tratadas solo con BAP a un nivel de confianza del 95%. Las plantas tratadas solo con ABA o con ABA+BAP no presentan diferencias significativas ni con el control ni con las plantas tratadas sólo con BAP.

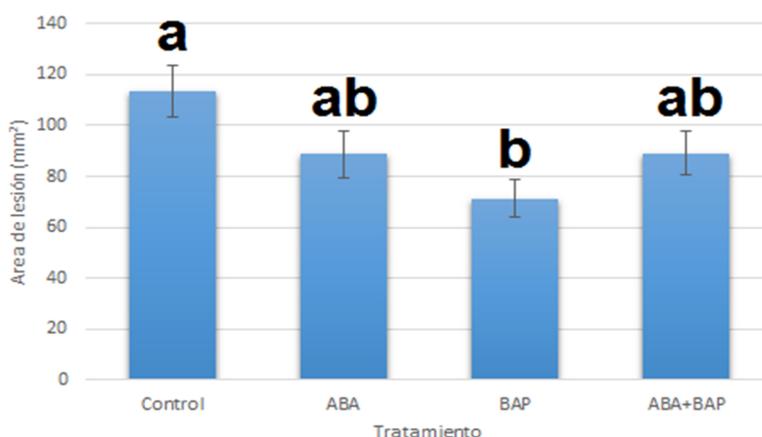


Figura 7. Efecto del ABA y el BAP sobre los síntomas causados por *B. cinerea*. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ). Los datos son medias  $\pm$  el error estándar.

### 4.2. Efecto de BAP y ABA sobre el contenido en fenoles.

Los fenoles solubles totales se midieron con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este método mide el estado oxidativo de las muestras, lo que se relaciona con la cantidad de fenoles por ser estos los compuestos más abundantes con capacidad reductora. No se observaron cambios en los fenoles totales en ningún tratamiento. Los datos se analizaron con un test de Kruskal-Wallis, ya que carecían de normalidad, lo que resultó en un p-valor de 0,6675, que al ser mayor de 0,05, confirmó que no había diferencias significativas.

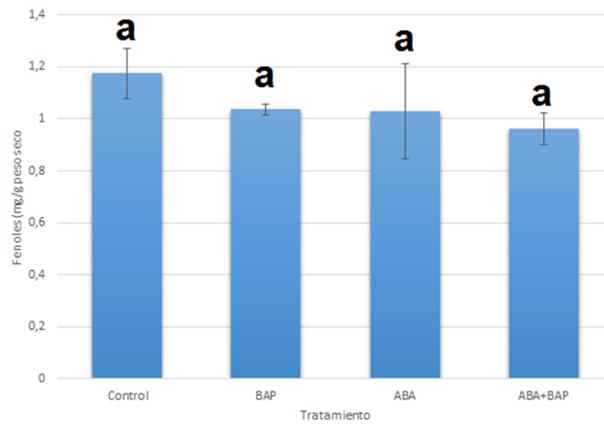


Figura 8. Efecto del ABA y el BAP sobre los fenoles totales. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ). Los datos son medias  $\pm$  el error estándar.

## 5. DISCUSIÓN

En este trabajo se han utilizado dos hormonas diferentes para inducir la respuesta inmune, el ácido abscísico (ABA) y la citoquinina BAP. Trabajos previos habían situado a estas dos hormonas como reguladores de la respuesta inmune en otros pato-sistemas (Choi *et al.*, 2011, Adie *et al.*, 2007), por ejemplo, Swartzberg *et al.* (2008), que observó cómo en las plantas de tomate mutantes que producían más citoquininas, se daba un retraso en la senescencia de las hojas, así como una reducción en la severidad de los síntomas de *Botrytis* en plantas de tomate. En este trabajo se ha observado que la aplicación de citoquininas, en concreto de BAP, produce una reducción en los síntomas de *Botrytis* en pimiento.

Para explicar esto, podríamos relacionarlo con las rutas que activa el BAP. En el trabajo de Díaz *et al.* (2002) se observa la gran importancia que presenta el SA junto con el etileno en la resistencia de tomate a *B. cinerea*. Esto cobra importancia si se tiene en cuenta que Choi *et al.* (2010), demostraron que el BAP tiene un papel en la modulación de la defensa de la planta a través de la señalización del SA.

Otro punto a tener en cuenta es el claro efecto antagónico que se observa cuando la planta se trata con ácido abscísico (ABA) y con citoquininas (BAP en nuestro caso). La reducción de los síntomas que se observó al aplicar BAP se anula si se aplica al mismo tiempo el ABA. Esto podría explicarse por un “cross talk” negativo entre estas dos hormonas, responsable de producir esta interacción antagónica (Pieterse *et al.*, 2012).

En cuanto al ABA y su papel en la resistencia a *B. cinerea*, experimentos anteriores demuestran que su papel en la resistencia no está tan claro. Audenaert *et al.*, (2002) demostraron que mutantes de tomate ABA-deficientes mostraron una mayor resistencia a *B. cinerea*. En cambio, Achuo *et al.*, (2006) observaron que las plantas de tomate expuestas a un estrés de sequía, en las cuales se alcanzan altos niveles de ABA, eran menos susceptibles al hongo. Sin embargo, cuando aplicaron el ABA de manera exógena este efecto no se observó. Esto podría significar que el ABA sí podría afectar a la susceptibilidad de la planta al hongo, pero quizás no lo haga cuando se aplica de manera exógena, como se observa en nuestro experimento. Por otro lado, Asselbergh *et al.* (2007) observaron cómo las plantas de tomate mutantes deficientes en ácido abscísico mostraban una menor resistencia a *B. cinerea*. Las plantas mutantes acumulaban más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumentando la incorporación de compuestos fenólicos en la pared celular creando una mayor protección de las células, proceso que el ABA evitaba. También observaron un efecto

sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plantas tratadas exógenamente con ABA. Teniendo esto en cuenta cabría esperar que los niveles de fenoles se redujesen al aplicar ABA, pero esto no ocurre en nuestros ensayos.

Los fenoles solubles totales se determinaron porque son un indicador de los procesos de respuesta a un patógeno en las plantas. Diferentes autores como por ejemplo Pardiño (2016) han observado un patrón en el cual en contacto con un patógeno, por ejemplo *B. cinerea*, las plantas responden reduciendo la concentración de estos compuestos. Hay diferentes teorías que explican este descenso y por qué está ligada la respuesta de la planta a los patógenos. Una de ellas se centra en la biosíntesis de la lignina, un compuesto sintetizado a partir de fenoles a través del cual la planta generaría barreras que la mayoría de los microorganismos patógenos no pueden degradar, utilizándolo así como una barrera física al patógeno (Moura *et al.*, 2010).

Otra teoría que trata de explicar la relación entre el descenso de los fenoles y los procesos de defensa es que en situaciones de estrés se acumulan las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos compuestos tienen diferentes funciones dentro de la célula, tales como reforzar la pared celular, inhibir directamente al patógeno o incluso actuar como moléculas señal para activar rutas de defensa (Grosskinsky *et al.*, 2011). Su relación con los fenoles puede deberse a que los ROS son extremadamente oxidantes, por lo que causan daños dentro de las células cuando se encuentran en grandes concentraciones. Este hecho provoca que dentro de la célula se consuman sustancias antioxidantes como, por ejemplo, los fenoles, tal y como observaron Smith *et al.*, (2010). Todo esto tiene que ver con los procesos de defensa dado que la señalización de la ruta del SA regula su mecanismo de acción mediante la generación de ROS (Veloso *et al.*, 2014). En nuestro caso no se da este descenso de fenoles, al menos no de manera significativa, pero en los experimentos de Pardiño (2016) en judías sí aparecen estas diferencias cuando se aplica BAP. A la luz de lo anterior, podemos suponer que la hormona actúa de manera diferente en pimiento y en judía o, en todo caso, que tal vez en pimiento sea necesaria una concentración mayor de BAP para que este efecto sea observable. En el caso del ABA volviendo a lo mencionado anteriormente del trabajo de Asselbergh *et al.* (2007), la no acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas tratadas exógenamente con ABA esto explicaría que no haya este descenso de fenoles ya que al haber menos ROS los fenoles no se oxidan para evitar daños como mencionamos anteriormente y por lo tanto, podría explicar por qué, no hay alteraciones en los niveles de fenoles con respecto al control.

## 6. CONCLUSIONES

### Castellano

1. La aplicación exógena de BAP en las hojas de *Capsicum annuum* reduce significativamente el área de lesión producida por *Botrytis cinerea*, pero no cuando se aplica ABA lo que sugiere un proceso de “cross-talk” antagónico, que reduce los efectos beneficiosos del BAP.
2. No hay una reducción significativa en el nivel de fenoles de la planta con ninguno de los tratamientos.

### Galego

1. A aplicación exóxena de BAP nas follas de *Capsicum annuum* reduce significativamente o área de lesión producida por *Botrytis cinerea*, pero non cando se aplica ABA o que suxire un proceso de “cross-talk” antagónico, que reduce os efectos beneficiosos do BAP
2. Non hay unha redución significativa no nivel de fenóis da planta con ningún dos tratamentos.

### English

1. The exogenous application of BAP to the leaves of *Capsicum annuum* reduces significantly the area of lesion produced by *Botrytis cinerea*, but it is not reduced when ABA is applied suggesting a process of antagonistic cross-talk, which reduces the beneficial effects of BAP.
2. There is no significant reduction in the plant phenolic concentration with none of the treatments.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Achuo, E. A., Prinsen, E. y Hofte M. (2006). Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathol.* 55: 178–186.
- Adie, B. A. T., Schmelz, E. A., Solano, R., y Gene, D. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 1665–1681.
- Asselbergh, B., Curvers, K., Franc, S. C., Audenaert, K., & Vuylsteke, M. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis, *Plant Physiol.* 144: 1863–1877.
- Audenaert, K., De Meyer, G.B. y Höfte, M., (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signalling mechanisms. *Plant Physiol.* 128: 491–501.
- Bleecker, A. y Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 13–18.
- Boller, T. (1991). Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In AK Mattoo, JC Suttle, eds, *The plant hormone ethylene*. CRC, Boca Raton, FL, pp 293–314.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F.C. y Cammue, B.P.A. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 393–416.
- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 183–205.
- Choi, J., Huh, S.U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K.H. y Hwang, I. (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 19:284–95.
- Choi, J., Choi, D., Lee, S., Ryu, C.M. y Hwang, I. (2011). Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends Plant Sci.* 16: 388–94.
- Cohen, Y. y Gisi, U. (1994). Systemic translocation of <sup>14</sup>C-DL-3 aminobutyric acid in tomatoplants in relation to induced resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45: 441-456.

- da Rocha, A.B. y Hammerschmidt, R. (2005). History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. *HortTechnology* 15: 518–529.
- Díaz, J., Have, A. y van Kan, J. A. L. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 129: 1341–1351.
- Droby, A. y Lichter, A. (2004). Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N., eds), pp. 349–367. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Elad, Y., Vivier, M. y Fillinger, S. (2016). *Botrytis*, the Good, the Bad and the Ugly. In: Fillinger S, Elad Y (eds) *Botrytis-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer International Publishing Switzerland. pp 1, 1–15.
- Germeier, C., Hedke, K. y von Tiedemann, A. (1994). The use of pH-indicators in diagnostic media for acid-producing plant pathogens. *J. Plant Dis. Prot.*, 101: 498–507.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205–27.
- Grosskinsky, 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. y Roitsch, T. (2011). Cytokinins mediate resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signaling. *Plant Physiol.* 157: 815–830.
- Hoagland, D. y Arnon, D. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley (California): College of Agriculture, University of California.
- Lyon, G. (2007). Agents that can elicit induced resistance. In D Walters, A Newton y G Lyon, eds, *Induced resistance for plant disease control: a sustainable approach to crop protection*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 9–29.
- Moura, J.C.M.S., Valencise, C.A., De Oliveira, J., Carnier, M. y Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Int. Plant Biol.* 52: 360–376.
- Nafisi, M., Fimognari, L., y Sakuragi, Y. (2015). Phytochemistry interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry* 112: 63–71.

- Nuez, F.; Gil, R. y Costa, J. (1996). *El cultivo de pimientos, chiles y ajies*. Mundi-Prensa, Madrid. p. 15-29 y 38-53.
- Pardiño, C. (2016). Regulación da resistencia a *Phytophthora capsici* por citocininas en feixón. Trabajo de fin de grado. UDC.
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J., y Voeselek, L.A. (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci.* 11: 176–183.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., y Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28: 489–521.
- Resende, MLV., Nojosa, GBA., Cavalcanti, LS., Aguilar, MAG., Silva, LHCP., Perez, JO., Andrade, GCG., Carvalho, GA. y Castro, RM. (2002). Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahlia* by acibenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathol.* 51: 621–628.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. y Jones, JDG. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 317–343.
- Shafia, A. (2009) Latent infection of *Botrytis cinerea*. Tesis doctoral, University of Reading.
- Smith, A., Coupland, G., Dolan, L., Harberd, N., Jones, J., Martin, C., Sablowski, R. y Amey, A. (2010) *Plant biology*. Garland Science.
- Swartzberg, D., Kirshner, B., Rav-David, D., Elad, Y., y Granot, D. (2008). *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the IPT gene. *Eur. J. Plant Pathol.* 120: 289–297.
- Tenberge, K.B. (2004). Morphology and cellular organization in Botrytis interactions with plants. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad, Y. *et al.*, eds), pp. 67–84, Kluwer Academic Publishers.
- van Kan, J. A. L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.*, 11: 247–253.
- van Kan J.A., Shaw, M.W. y Grant-Downton, R.T. (2014) Botrytis species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue? *Mol. Plant Pathol.*, 15: 957–961.
- Veloso, J., García, T., Bernal, A., y Díaz, J. (2014). New bricks on the wall of induced resistance : salicylic acid receptors and transgenerational priming, *Eur. J. Plant Pathol.* 138: 685-693.

- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., y Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. of Phytophatol.* 47: 177–206.
- Walters, D.R. y McRoberts, N. (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends Plant Sci.* 11:581–86.
- Walters, D.R., Havis, N.D., Paterson, L., Taylor, J. y Walsh, D.J. (2011). Cultivar effects on the expression of induced resistance in spring barley. *Plant Dis.* 95: 595–600.
- Walters, D.R., Ratsep, J. y Havis, N.D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J. Exp. Bot.* 64: 1263-1290.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., y Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea* The cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8: 561–580.
- Worrall, D., Holroyd, G.H., Moore, J.P., Glowacz, M., Croft, P., Taylor, J.E., Paul, N.D. y Roberts, M.R. (2012). Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. *New Phytol.* 193: 770–778.