

Traballo Fin de Máster

Indución de resistencia a *Botrytis cinerea* en *Solanum lycopersicum* mediante a aplicación dunha combinación de fitohormonas

Inducción de resistencia a *Botrytis cinerea* en *Solanum lycopersicum* mediante la aplicación de una combinación de fitohormonas

Induction of resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicum* by treatment with a combination of plant hormones



Paula Hermida Mera

Director: José Díaz Varela



D. JOSÉ DÍAZ VARELA, PROFESOR TITULAR DE FISIOLÓGÍA VEGETAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMA:

Que el presente Trabajo de Fin de Máster presentado por la alumna PAULA HERMIDA MERA y titulado

“Inducción de resistencia a *Botrytis cinerea* en *Solanum lycopersicum* mediante la aplicación de una combinación de fitohormonas”

“Inducción de resistencia a *Botrytis cinerea* en *Solanum lycopersicum* mediante a aplicación dunha combinación de fitohormonas.

“Induction of resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicum* by treatment with a combination of plant hormones”

ha sido realizado bajo su dirección y autoriza su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firma el presente informe en A Coruña, a 4 de Setiembre de 2018.

Fdo. José Díaz Varela

0.	RESUMO/RESUMEN/ABSTRACT.	1
1.	ANTECEDENTES E ESTADO ACTUAL.	3
1.1.	O patóxeno e a planta hóspede.	3
1.1.a.	O patóxeno: <i>Botrytis cinerea</i> .	3
1.1. b.	Hóspede: <i>Solanum lycopersicum</i> .	5
1.2.	Estratexias de loita contra o patóxeno e as súas limitacións.	7
1.3.	Resistencia inducida.	11
1.4.	Modulación hormonal nos sistemas de defensa nas plantas.	13
1.4.1.	Xasmonatos.	14
1.4.2.	Brasinoesteroides.	15
1.4.3.	Interaccións entre fitohormonas.	16
2.	HIPÓTESE.	17
3.	OBXECTIVOS.	17
4.	METODOLOXÍA.	17
4.1.	Material biolóxico.	17
4.2.	Inoculación.	18
4.3.	Tratamento.	18
4.4.	Recollida e mantemento de mostras.	18
4.5.	Determinación de síntomas.	19
4.6.	Cuantificación da colonización con PCR en tempo real.	19
4.7.	Determinación da cantidade de H_2O_2 e O_2^- .	20
4.8.	Ensaio encimáticos.	21
4.8.1.	Extracción e medida de proteínas totais.	21
4.8.2.	Determinación da actividade encimática : Actividade da superóxido dismutasa, da catalasa e da ascorbato peroxidasa.	21
4.9.	Determinación da expresión dos xenes superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa.	22
4.9.1.	Extracción do RNA e síntese do cDNA.	22
4.9.2.	q-PCR.	23
5.	PLAN DE TRABALLO.	24
6.	CUESTIÓN ÉTICAS.	25
7.	APLICABILIDADE.	25
8.	PLAN PARA A DIFUSIÓN DOS RESULTADOS.	25
9.	RECURSOS NECESARIOS.	26
10.	BIBLIOGRAFÍA.	28

0. RESUMO/RESUMEN/ABSTRACT.

RESUMO

O fungo patóxico *Botrytis cinerea* é o causante de importantes perdas en multitude de cultivos. Un xeito de combater os seus efectos é a indución de resistencia en especies hóspede utilizando diferentes sustancias como poden ser as fitohormonas. No presente estudio deséñanse varios ensaios coa finalidade de demostrar o efecto sinérxico da aplicación exóxena de dúas fitohormonas (brasinoesteroides e xasmonatos) na redución dos danos causados por *B. cinerea* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Para comprobar a eficacia do tratamento analizaranse a incidencia e a severidade da enfermidade, realizarase a cuantificación da colonización da planta polo patóxico e mediranse marcadores da resposta defensiva da planta como a concentración de H_2O_2 e O_2^- , a actividade das encimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa e ascorbato peroxidasa e a expresión dos xenes que codifican ditas encimas.

RESUMEN

El hongo patóxico *Botrytis cinerea* causa importantes pérdidas en multitud de cultivos. Una forma de reducir sus efectos es la inducción de resistencia en especies huésped utilizando diferentes sustancias como las fitohormonas. En el presente proyecto se diseñan varios ensayos con la finalidad de demostrar el efecto sinérgico de la aplicación exóxena de dos fitohormonas (brasinoesteroides y jasmonatos) en la redución de los daños causados por *B. cinerea* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Para comprobar la eficacia del tratamiento se analizarán la incidencia y la severidad de la enfermedad, se realizará la cuantificación de la colonización de la planta por el patóxico y se medirán marcadores de la respuesta defensiva de la planta como la concentración de H_2O_2 y de O_2^- , la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa y la expresión de los genes que codifican dichas enzimas.

ABSTRACT

The pathogenic fungus *Botrytis cinerea* causes significant crop losses in a wide variety of plant species. One way to reduce such losses is the use of resistance inducers such as phytohormones. In the present project several assays were designed in order to demonstrate the synergistic effect of the exogenous application of two phytohormones (brassinosteroids and jasmonates) in the reduction of damages caused by *B. cinerea* in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). To check the effectiveness of the treatment we planned to analyse the incidence and the severity of the disease, the quantification of fungal development on plant tissue, the quantification of defensive response markers as H_2O_2 and O_2^- levels, the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase) and the expression of the genes coding for these enzymes.

1. Antecedentes e estado actual.

1.1. O patóxeno e a planta hóspede.

1.1. a) O patóxeno: *Botrytis cinerea*.

Botrytis cinerea é un fungo patóxeno que afecta a 586 xéneros de plantas (Elad *et al.*, 2016). O seu control é tremendamente complexo, xa que ten diferentes modos de ataque e pode sobrevivir durante longos períodos en restos dos cultivos formando estruturas de resistencia. Por outra banda, como consecuencia da súa gran plasticidade xenética desenvolveu resistencia a moitos dos fungocidas utilizados para o seu control (Williamson *et al.*, 2007). Todo o anterior pon en evidencia a necesidade de novos estudos e técnicas para conseguir unha redución das perdas causadas polo patóxeno.

O fungo estudado pertence ao Phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina, clase Leotiomycetes, orden Heliotales, Familia Sclerotiniaceae, xénero *Botryotinia* e especie *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (teleomorfo), *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (anamorfo).

En canto a súa estratexia de ataque, *Botrytis cinerea* é un patóxeno necrotrofo, é dicir, induce a morte nas células do hóspede e obtén a materia destas células mortas. Para iso produce encimas que degradan a parede celular, metabolitos fitotóxicos (o máis estudado é o botridial) e compostos de baixo peso molecular. Pero este comportamento non é o único que presenta a especie. Tamén se observou a súa capacidade de colonizar plantas como endófito (sen causar ningún síntoma) a curto prazo (van Kan *et al.*, 2014). Mesmo se observou a capacidade das esporas do fungo de infectar sementes, producir hifas nos tecidos do hóspede a medida que este se desenvolve, e transformar o seu comportamento en patóxeno cando a planta florece. A comprensión do mecanismo polo cal este comportamento como endófito facultativo se transforma en necrotrofo e as condicións nas que sucede poden ser de gran axuda para entender as relacións entre a planta e o fungo (van Kan *et al.*, 2014)

Os conidios (esporas asexuais) producidos nos esclerocios (estruturas de resistencia) ou en micelios que sobreviven en tecidos mortos ou en sementes, actúan como inóculos primarios a comenzos da primavera. A liberación dos conidios sucede a primeira hora da mañá. Co aumento da temperatura e o descenso da humidade, os conidióforos sofren cambios morfolóxicos que desencadean a liberación das esporas

asexuais (Williamson *et al.*, 2007). A dispersión dos conidios sucede principalmente por correntes de aire, pero as gotas de auga e algún insecto tamén poden participar na dispersión. A xerminación sucede en condicións de humidade relativa alta, e se se produce a penetración do hóspede fórmase un novo micelio.

O ciclo sexual implica a formación de microconidios que actúan como espermacios. A espermatización do esclerocio desencadea a formación de apotecios, nos que se desenvolven ascas con 8 ascosporas binucleadas. A formación de apotecios en cultivos infectados é rara ou non está descrita.

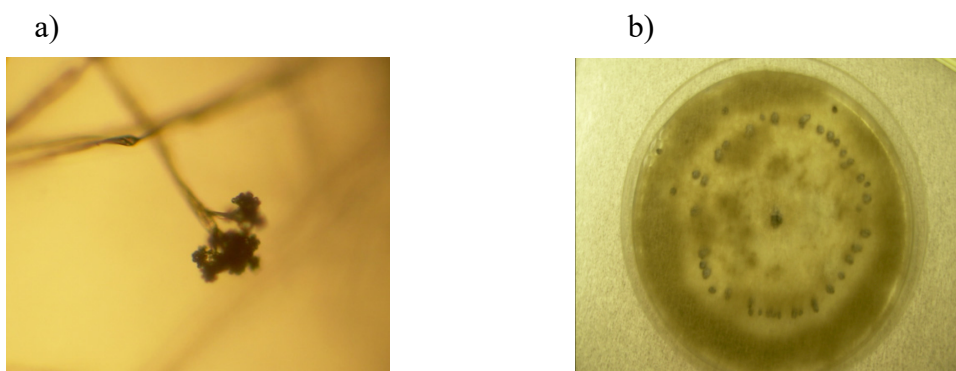


Fig.1.a) Conidioforos de *Botrytis cinerea*. Modificado de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Botrytis_conidiophore_40X.png#/media/File:Botrytis_conidiophore
b) Anel de esclerocios de *Botrytis cinerea*. Dispoñible en: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Botrytis_plate.png#/media/File:Botrytis_plate.png

Para a penetración de plantas sás, o apresorio (estrutura de penetración) non pode romper a cutícula das follas de forma exclusivamente mecánica, como sucede con outras especies, e segrega encima como lipasas e cutinasas para conseguilo.

A penetración da cutícula e as lesións que se forman no hóspede desencadean, en primeiro lugar, un estalido oxidativo, que afecta tanto á membrana plasmática do hóspede como á matriz extracelular que rodea as hifas. Parece probable que este proceso remate desencadeando a morte celular programada nas células infectadas (van Kan, *et al.*, 2014). As hifas tamén poden penetrar no hóspede a través de feridas ou aperturas naturais.

Botrytis cinerea ten un amplo rango de hóspedes: máis de 586 xéneros, a maioría plantas con sementes (Elad *et al.*, 2016), son atacados por este fungo que afecta diferentes partes do hóspede: flores, follas, talos... Moitas destas plantas son cultivos de gran importancia económica e algúns exemplos son o tomate, a cenoria, a vide, o amorodo, a framboesa... Nalgún cultivo de legumes, como garavanzos, as perdas poden ser moi importantes e ter gran impacto na economía de certas áreas agrícolas. Outras especies hóspedes son comercializadas como flores cortadas, como as rosas e xerberas. Froitos como o kiwi, peras e mazás almacenados a baixas temperaturas durante períodos longos tamén son atacados polo patóxeno (Williamson *et al.*, 2007).

1.1. b) Hóspede: *Solanum lycopersicum* L.

O tomate é orixinario da rexión andina e foi domesticado en México. No século XVI (1544) introduciuse en Europa, e mentres nalgúns países foi destinado ao consumo humano, noutros só se utilizaba como planta ornamental ou para usos medicinais (Mapama, 2008).

En canto ás características morfolóxicas, o tomate é unha planta perenne de porte arbustivo que é cultivado como anual. Pode desenvolverse de xeito rasteiro, semierecto ou erecto. Ten unha raíz principal profunda con numerosas raíces secundarias. Aproximadamente o 70% das raíces son superficiais. Os talos, de ata 2 metros, teñen de 2 a 4 centímetros de diámetro na base. Presentan pelos glandulares e non glandulares. As follas son pinnado-compostas duns 50 cm de longo. As flores son radiais, con 5 estames, de ovario súpero bicarpelar ou multicarpelar. O froito é moi variable en canto a tamaño e forma, dependendo da variedade (Mapama, 2008).

Presenta un período de crecemento de entre 90 e 150 días, cuns óptimos de temperatura diurnos entre os 18 e os 25 °C e nocturnos entre os 10 e 20 °C, sendo altamente sensible ás xeadas. Os climas secos son os máis axeitados para o cultivo desta especie, xa que unha alta humidade favorece a aparición de enfermidades.

Na actualidade, segundo a FAO, dedícanse sobre 5 millóns de hectáreas en todo o planeta a este cultivo e a súa produción ascende ás 170 millóns de toneladas (Figuras 3, 4) (FAOSTAT, 2018).

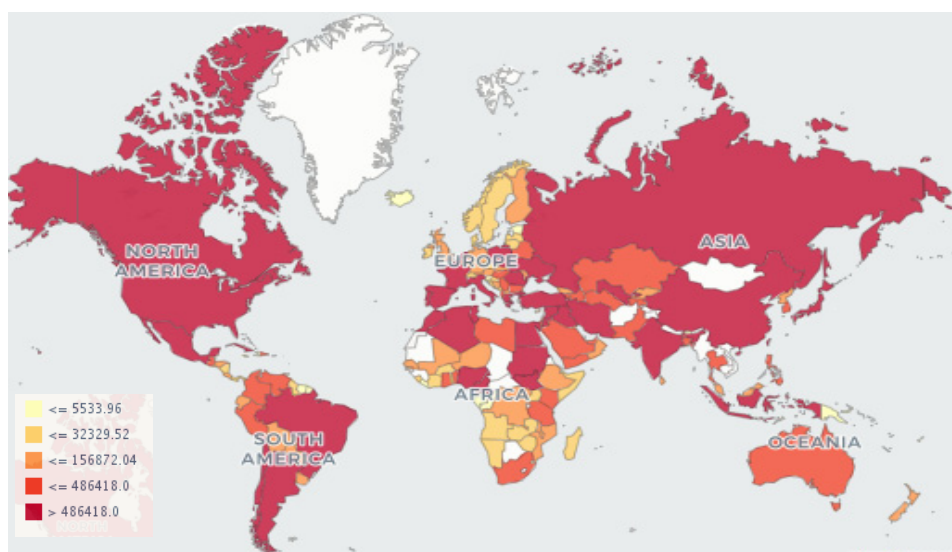


Fig. 3. Producción de tomate fresco por país en toneladas (años 1994-2016) (FAOSTAT)

A demanda do produto aumenta continuamente e con ela o seu cultivo, produción e comercio.

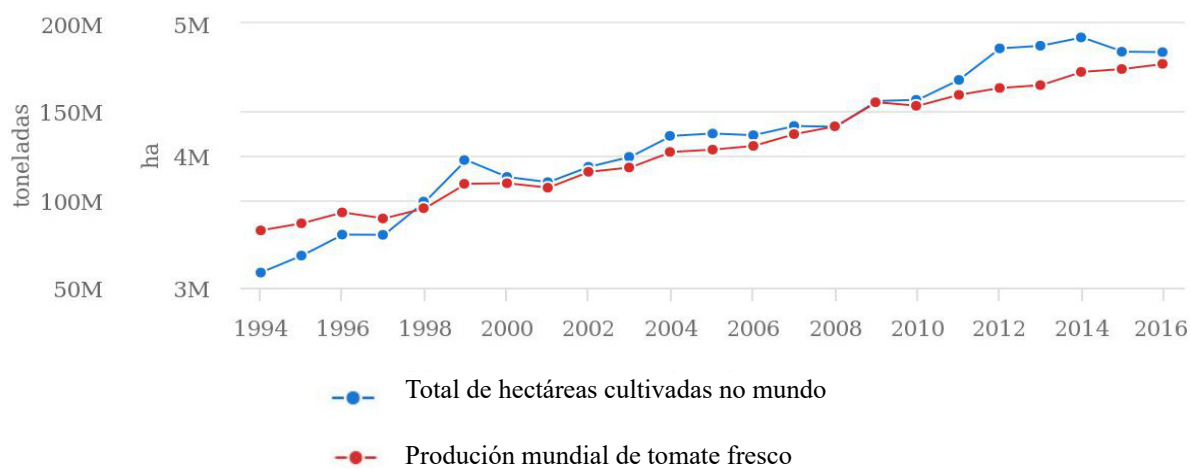


Fig. 4 Evolución do cultivo de tomate entre os anos 1994-2016. (FAOSTAT)

O principal produtor do mundial é China, seguido de USA (Figura 5). España ocupa o oitavo posto, producindo case 4 millóns de toneladas anualmente.

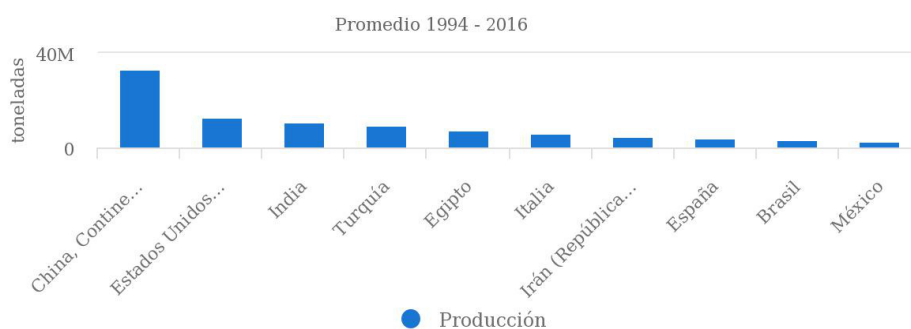


Fig. 5. Principais países produtores de tomate fresco (FAOSTAT)

1. 2. Estratexias de loita contra o patóxeno e as súas limitacións.

A loita contra as pragas e enfermidades é un dos grandes problemas aos que se enfrenta a agricultura na actualidade. De feito, estímase que entre o 20 e o 40% de toda a produción mundial se perde por esta causa. Para reducir estas perdas, as estratexias deben integrar e coordinar diferentes aspectos, como as prácticas de cultivo, o uso de variedades axeitadas e diversos métodos de control químico e biolóxico (Villa *et al.*, 2017).

O control químico baséase no uso de funxicidas sintéticos que afectan a diversos aspectos da fisioloxía do patóxeno (respiración, osmoregulación, organización de microtúbulos...). En función da súa localización na planta diferéncianse tres clases: sistémicos, de contacto e penetrantes. Os sistémicos son absorbidos e transportados polos tecidos internos da planta, polo que non necesitan un contacto directo co patóxeno, mentres que os de contacto, que permanecen na superficie, si o necesitan (Jacometti *et al.*, 2010). Os penetrantes introdúcense nos tecidos da planta pero non son transportados tan eficazmente como os sistémicos.

Na actualidade, estas substancias teñen limitacións no seu uso debido a lexislacións restritivas, á preocupación polo impacto que poden causar na saúde ou no medio ambiente e á resistencia que desenvolven os patóxenos (Villa *et al.*, 2017).

Unha mostra de fungicidas usados contra *B. cinerea* e algunhas das súas características inclúense na táboa 1.

Táboa 1. Fungicidas utilizados contra *Botrytis cinerea* (Modificado de Jacommetti *et al.*, 2010).

Sustancia activo	Grupo químico	Propiedades/modo de acción	Risco de resistencia
Thiram	Disulfuro	Ampla espectro/contacto	Baixo
Captan	Imida ciclica	Ampla espectro	Alto
Tolyfluanid	Sulfamida	Ampla espectro/contacto	Alto
Metil tiofanato	Benziomidazol	Ampla espectro/sistémico	Alto
Iprodiona	Dicarboximida	Ampla espectro/contacto	Alto
Pirimetanil	Anilinopirimidina	Específico botritis/contacto	Alto
Fenhexamida	Hidroxianilida	Específico botritis/inhibe o crecemento do micelio	Medio

En canto ao control biolóxico, considéranse catro tipos:

- a) Clásico: Consiste na introdución dun axente de control biolóxico (BCA) exótico para a súa aclimatación e control da praga a longo prazo.
- b) Control biolóxico por inundación: Consiste na introdución masiva de organismos vivos para o control de pragas.
- c) De conservación: Ten como finalidade favorecer as poboacións de inimigos naturais das pragas presentes nos cultivos, sen necesidade da introdución de novas especies no medio.
- d) Aumentativo (de inoculación): Liberación de organismos repetidas veces para o control de pragas (Eilenberg *et al.*, 2001).

Por mor da súa expansión xeneralizada, a súa taxa de crecemento rápida e a baixa taxa de infección por parasitos, a utilización clásica dun único axente de control biolóxico non parece unha possibilidade real e axeitada para a loita de *Botrytis cinerea*.

O segundo tipo de control é o máis utilizado e a súa eficacia aumenta mesturando BCAs ou utilizando diferentes cepas do mesmo BCA. Estas mesturas, transformadas en diferentes presentación (po, pellets, xeles..) son comercializadas como biofungicidas. Algúns dos problemas asociados aos biofungicidas derivan do seu carácter preventivo, é dicir, non soen ser efectivos despois da infección, e a súa eficacia depende en gran medida das condicións climáticas. Na táboa 2 móstranse algúns dos organismos utilizados na loita contra *B. cinerea* e o seu modo de acción.

Táboa. 2. Biofungicidas utilizados contra *B. cinerea* (Modificado Jacometti *et al.*, 2010)

Organismo	Modo de acción
<i>Trichoderma harzianum</i>	Exclusión competitiva, antibiose, interrupción encimática, indución das defensas do hóspede.
<i>Trichoderma harzianum</i> and <i>Trichoderma polysporum</i>	Exclusión competitiva, antibiose, interrupción encimática, indución das defensas do hóspede.
<i>Trichoderma harzianum</i> and <i>Tricoderma viridae</i>	Exclusión competitiva, antibiose, interrupción encimática, indución das defensas do hóspede.
<i>Ulocadium oudemansi</i>	Exclusión competitiva
<i>Candida saitoana</i>	Parasito, antibiose e indución das defensas do hóspede
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Indución das defensas do hóspede, antibiose

A xestión dos cultivos para reducir a incidencia da enfermidade depende da especie utilizada e moitas veces son necesarias medidas específicas. Pero, de xeito xeral, está comprobado que factores como a alta humidade, escasa luminosidade e temperaturas moderadas favorecen a expansión do fungo (Willamson *et al.*, 2007).

Por exemplo, a poda e eliminación de restos de follas nas vides dificulta a expansión da enfermidade . Por unha banda, o aumento da exposición a luz ultravioleta

en certas partes da planta aumenta a produción dunha fitoalexina, unha substancia que inhibe o crecemento de varios patóxenos e, por outra, reduce o contacto entre as uvas dentro dos acios, o que dificulta a expansión do fungo (Jacometti *et al.*, 2010).

Outro exemplo é o uso de cubertas de plásticos en cultivos de amorodo. Esta práctica chega a reducir a incidencia da enfermidade ata un 90% (Xiao *et al.*, 2001).

Pero na loita contra as pragas e enfermidades non se aplica unha única estratexia das citadas anteriormente, senón que se combinan e coordinan para conseguir unha maior eficacia, é dicir, empregase a loita integrada. Cabe destacar a importancia a nivel internacional do control integrado de pragas (IPM), definido pola FAO como aquel no que se obteñen uns cultivos sans reducindo o uso do control químico, utilizando todas as técnicas alternativas das que se dispón e promovendo un control máis natural das pragas. O IPM pretende minimizar os riscos para a saúde e o medio ambiente derivados do control de enfermidades. Algunhas das medidas recomendadas son: utilizar variedades axeitadas de plantas e BCAs adecuados ás condicións climáticas, eliminar de xeito sistemático os restos mortos do cultivo para eliminar fontes de inóculo, usar leitos orgánicos, optimizar o espazo entre plantas, realizar podas axeitadas, conseguir unha boa ventilación mediante a eliminación de malas herbas, controlar a presenza de insectos que actúen como vectores, etc. (Williamson *et al.*, 2007).

No marco do IPM, a resistencia inducida debe de ser considerada unha ferramenta de gran utilidade. O uso de fitohormonas como substancias indutoras permite, ademais de loitar contra as enfermidades evitando o uso de compostos que poden alterar o medio, acadar unha maior comprensión das relacións que se establecen entre a planta e o patóxeno e as complexas funcións destas sustancias na planta.

1.3. Resistencia inducida.

As plantas presentan multitude de estratexias defensivas para superar situacións, causadas por factores tanto bióticos como abióticos, que dificultan o seu desenvolvemento. Atendendo á necesidade de contacto previo cun patóxeno, as defensas clasifícanse en constitutivas e inducidas. As primeiras están presentes sen necesidade de contacto previo co patóxeno e son tanto físicas como químicas. As paredes celulares, ceras da epiderme, tricomas, cortizas e metabolitos secundarios tóxicos con capacidade de inhibir o crecemento de organismos son algúns exemplos de defensas constitutivas. No segundo tipo inclúense respostas activas desencadeadas tras o recoñecemento do patóxeno. Este evento induce unha serie de procesos que inclúen modificacións na parede celular mediante a produción de lignina e calosa, fluxos iónicos, un estalido oxidativo (*oxidative burst*), activación de cascadas de quinasas, cambios transcripcionais e produción de compostos antimicrobianos, como as proteínas relacionadas coa patoxénese (PR) e as fitoalexinas (Spoel e Dong, 2012). As proteínas PR clasifícanse en 17 familias e a súa síntese pode ser inducida por fitohormonas como o ácido salicílico, o ácido xasmónico ou o etileno. As proteínas PR poden posuír actividade antimicrobiana, capacidade de degradación de paredes celulares, toxicidade e participar na sinalización das defensas (Van Loon *et al.*, 2006).

Despois do primeiro ataque dun patóxeno, as plantas vólvense máis resistentes fronte novos ataques; isto é coñecido como resistencia inducida (Angulo *et al.*, 2015). Esta resposta tamén pode ser desencadeada por organismos non patoxénicos ou mediante o uso de compostos naturais ou sintéticos. A indución da resistencia pode activar directamente as defensas ou desencadear un estado de “priming” (Walters *et al.*, 2013). Este estado permite ás plantas responder máis rápido e dun xeito máis eficaz fronte a novos ataques ou situacións de estrés (Goellner e Conrath, 2008).

Os dous tipos principais de resistencia inducida son a resistencia sistémica adquirida (SAR) e a resistencia sistémica inducida (ISR):

- SAR: pode ser inducida por tratamentos con diferentes axentes abióticos, como por exemplo o Acibenzolar-S-metil (ASM) ou mediante a infección de patóxenos necrotrofos. É un proceso mediado polo ácido salicílico (SA), xa que está asociado a un aumento desta fitohormona, tanto local como sistémicamente. Tamén implica a expresión de xenes de proteínas PR (Walters e Fountanie, 2009).

- ISR: desencadéase pola colonización das raíces por rizobacterias promotoras do crecemento vexetal (“*plant growth promoting rhizobacteria*” ou PGPR). As fitohormonas que participan na mediación da ISR son os xasmonatos e o etileno (Walters *et al.*, 2013).

Tanto SAR como ISR actúan de xeito non específico fronte diferentes grupos taxonómicos de patóxenos (Walters e Fountaine, 2009).

Multitude de axentes, tanto bióticos como abióticos, poden inducir resistencia a patóxenos nas plantas (Walters *et al.*, 2013). O comportamento destes axentes é moi dispar en diferentes especies de plantas e fronte a diversos patóxenos, o que dificulta o seu uso en cultivos (Walters e Fountaine, 2009).

Algúns dos axentes indutores abióticos máis importantes son: o xa citado ASM (Acibenzolar-S-metil), o ácido β -aminobutírico (BABA), o probenazol, o fosfito e o biochar (Walters *et al.*, 2013).

En canto aos bióticos, dun xeito xeral os podemos agrupar en fungos micorrícicos, rizobacterias e fungos promotores do crecemento vexetal, fungos do xénero *Trichoderma* e endofitos indutores obtidos a partir de estratos de algas (Walters *et al.*, 2013).

Actualmente, a resistencia inducida é un sistema de control moito menos eficaz que os pesticidas. Hai que ter en conta que é unha resposta do hóspede, polo que está condicionada por diversos factores como poden ser, entre outros, o xenotipo da planta ou as condicións do medio (Walters e Fountaine, 2009). Outro aspecto importante é a posible indución previa das plantas. Xa que a resistencia inducida pode ser desencadeada por diversos axentes presentes de xeito natural no medio, parece probable que as plantas presenten unha indución (polo menos parcial) anterior ao tratamento (Walters e Fountaine, 2009).

1.4. Modulación hormonal nos sistemas de defensa nas plantas.

As fitohormonas participan na regulación do crecemento, desenvolvemento e reprodución das plantas. Ademais, presentan un papel fundamental nas respostas de defensa. O ácido salicílico (SA) e os xasmonatos (JA) son as principais hormonas defensivas, pero hormonas como o etileno, ácido abscísico, xiberelinas, auxinas, citoquininas e brasinoesteroides tamén participan nas defensas da planta (Pieterse *et al.*, 2012).

O ácido salicílico é a principal fitohormona na regulación das defensas da planta fronte aos ataques de patóxenos biotrofos e hemibiotrofos, e como xa se citou anteriormente, tamén regula a SAR (Denanacè *et al.*, 2013).

O gas etileno (C₂H₄) é un regulador de multitude de procesos nas plantas como maduración de froitos, inhibición de crecemento de talo e raíces, senescencia e estrés abiótico. A súa acción nas defensas da planta pode ser positiva ou negativa dependendo do patóxeno e da especie de planta. Fronte patóxenos necrotrofos, actúa favorecendo a resistencia xunto cos xasmonatos (Pieterse *et al.*, 2012). No caso do tomate, aumenta a resistencia a *B. cinerea* (Díaz *et al.*, 2002).

As auxinas regulan moitos dos procesos de desenvolvemento da planta, como dominancia apical, xeotropismo da raíz, formación de raíces aéreas e laterais, follas, flores e desenvolvemento dos tecidos vasculares en plantas. Tamén están descritas outras accións que facilitan a infección dos patóxenos relacionadas con cambios na estrutura da parede celular como a produción de expansinas, encimas que actúan sobre ela facilitando a penetración do patóxeno (Denanacè *et al.*, 2013). O fungo utilizado neste traballo, *B. cinerea* pode sintetizar auxinas e liberalas ao medio *in vitro*, aínda que o papel destas *in vivo* non está claro (Nafisi *et al.*, 2015).

As citoquininas regulan procesos de crecemento e diferenciación celular. Tamén están relacionadas coa asimilación de nutrientes e nas respostas fronte a patóxenos (Nafisi *et al.*, 2015). O seu papel parece estar relacionado principalmente con biotrofos (Pieterse *et al.*, 2012). Pero observouse que tomates transxénicos con altos niveis de citoquininas melloran a súa resistencia a *B. cinerea* (Nafisi *et al.*, 2015).

O ácido abscísico (ABA) está relacionado coa resposta a estados de estrés abiótico. Múltiples estudos demostran que ten un efecto negativo na resistencia fronte a patóxenos necrotrofos (Nafisi *et al.*, 2015).

As xiberelinas controlan o crecemento celular mediante a degradación das proteínas inhibidoras do crecemento DELLA. A degradación destas proteínas aumenta a susceptibilidade a necrotrofos e a resistencia de biotrofos (Pieterse *et al.*, 2012).

1.4.1. Xasmonatos.

Os xasmonatos son fitohormonas lipídicas (oxilipinas) que regulan procesos de desenvolvemento da planta como o crecemento da raíz, a maduración de froitos, a senescencia e o desenvolvemento do polen. Tamén regulan respostas defensivas fronte estres biótico e abiótico (Yu *et al.*, 2009). A figura 6 mostra a estrutura química do ácido xasmónico.

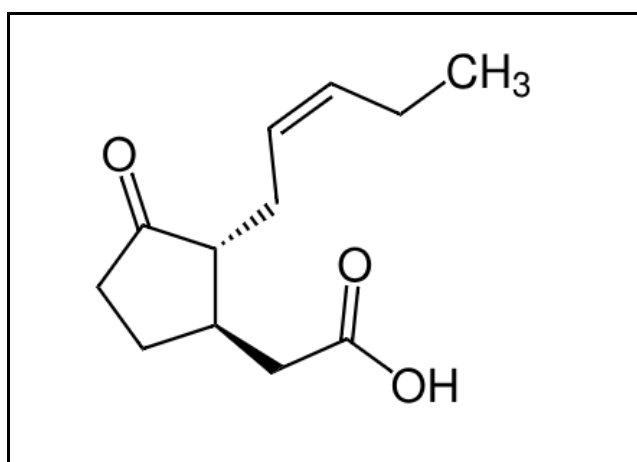


Figura 6. Estrutura do ácido xasmónico. Tomada de <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/51/Jasmonicacid.svg>

En canto á ruta de sinalización regulada por xasmonatos, *Arabidopsis* presenta dúas ramas principais, as denominadas MYC e a ERF, que desencadean a expresión de xenes diferentes. A MYC está asociada ao ataque de insectos e a ERF actívase por feridas e necotrofos e é dependente de etileno (Pieterse *et al.*, 2012). Unha vez que ditas rutas se activan localmente, unha resposta parecida pode desencadearse en partes da planta non danadas. Isto, nalgúns casos, induce á síntese de compostos tóxicos ou repelentes que protexen a planta fronte futuros ataques.

Hai múltiples exemplos que demostran que os xasmonatos participan e son eficaces á hora de inducir a resistencia fronte a patóxenos, tanto na planta como nos froitos. Algúns estudos relevantes inclúense na táboa 3.

Táboa 3. Especies nas que o tratamento con xasmonatos induce a resistencia a patóxenos.

Espece de planta/froito	Patóxeno	Referencia
Tomate	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>Xanthomonas campestris</i> <i>Verticillium dahlie</i> <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> <i>Phytophthora infestans</i>	Thaler <i>et al</i> (2004)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Yu <i>et al</i> (2009)
Vides	<i>Botrytis cinerea</i>	Wang <i>et al</i> (2015) Jiang <i>et al</i> (2015)

1.4.2. Brasinoesteroides.

Os brasinoesteroides son un conxunto de fitohormonas esteroideas que regulan procesos como o desenvolvemento das plántulas, organoxénese e reprodución (Nafisi *et al.*, 2015). Debido á súa eficacia á hora de mellorar o rendemento dos cultivos son amplamente usadas como hormonas de crecemento. O máis potente de todas estas hormonas esteroideas é o brasinólido (BL) (Figura 7)(Belkhadir *et al.*, 2011).

En canto á súa función nas defensas, está demostrado que desempeñan un papel fundamental nas respostas ao estrés, tanto abiótico como biótico (Song *et al.*, 2017). Por exemplo, tratamentos con brasinoesteroides melloran a saúde e supervivencia da planta en presenza de metais pesados, temperaturas extremas, seca ou inundacións (Bjornson *et al.*, 2016). Ademais, en diferentes especies de mono e dicotiledóneas, como por exemplo en tabaco, arroz e cogombro inducen resistencia fronte bacterias, fungos e virus patóxenos (Zhang *et al.*, 2015). Por outra banda, Song *et al.*, en 2017, demostraron a participación da fitohormona na resistencia fronte a nematodos en tomate, e Bjornson *et al.*, en 2016, conclúen que en plantas de *Arabidopsis* nas que se induciu a resistencia por feridas e tratadas con BL, as lesións causadas polo *B. cinerea* son considerablemente menores que nas plantas non tratadas con dito regulador.

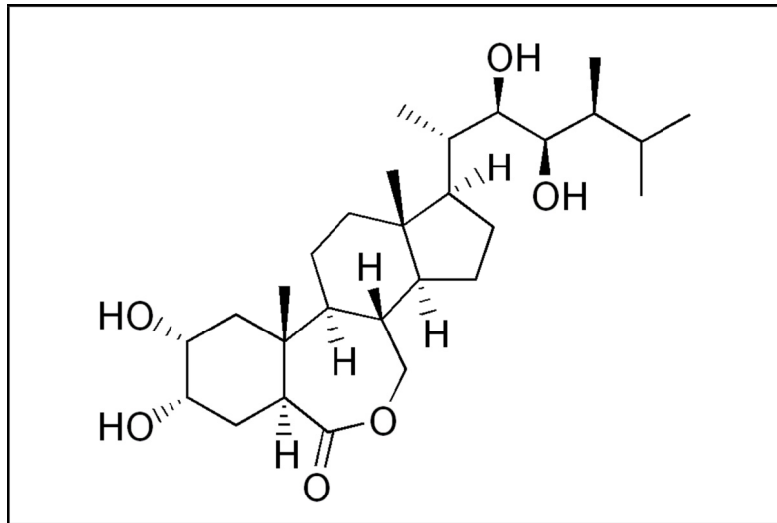


Figura 7. Estrutura do brasinólido. Tomada de <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Brassinolide.png>

A sinalización desencadeada polos BR comeza cando se unen a un dominio extracelular dunha proteína receptora con actividade quinasa, a BRI1. Esta unión permite a activación do dominio intracelular con actividade quinasa BAK11 que implica unha serie de eventos que rematan coa expresión de xenes dependentes de BR. BAK11 tamén está relacionada coa percepción de moléculas dos patóxenos, polo que a través deste co-receptor establécese a relación entre o recoñecemento dos patóxenos e a actividade das fitohormonas (Belkhadir *et al.*, 2011).

1.4.4. Interaccións entre as fitohormonas.

Os reguladores non actúan illadamente, senón que o fan dun modo coordinado e conxunto. Isto é posible grazas ás complexas interaccións (sinérxicas ou antagónicas) que se establecen entre as súas rutas, permitindo as plantas responder dun xeito preciso e eficiente a infinidade de situacións de estrés. Algúns exemplos destas interaccións son o papel supresor do SA na ruta regulada por xasmonatos, a regulación negativa das auxinas na ruta mediada por SA fronte a patóxenos biotrofos, a sinerxia que se establece entre SA e citoquininas e a inhibición mediada por ABA da ruta regulada por SA (Pieterse *et al.*, 2012).

En canto aos dous tipos de fitohormonas obxectivo de estudo no traballo, dos xasmonatos sábese que modulan rutas de sinalización relacionadas co estrés como as

reguladas por SA. Estas relacións poden ser sinérxicas, antagónicas ou neutras pero parece que as antagónicas son máis frecuentes (Pieterse *et al.*, 2012). Polo que atinxe aos BR, poden actuar dun xeito interdependente con outras hormonas promotoras do crecemento como GA e auxinas. Por outra banda, tamén aumentan a síntese de oxilipinas como os xasmonatos (Bjornson *et al.*, 2016).

Tendo en conta o exposto, parece probable que tanto xasmonatos como brasinoesteroides participen na resistencia en tomate fronte a *B. cinerea* e que se estableza unha relación sinérxica entre as rutas mediadas polas mesmas.

2. Hipótese.

Os xasmonatos e os brasinoesteroides actúan de modo sinérxico na indución de resistencia a *Botrytis cinerea* en *Solanum lycopersicum*.

3. Obxectivos.

1. Estudar a eficacia da aplicación esóxena de xasmonatos e brasinoesteroides na indución da resistencia a *Botrytis cinerea* en tomate.

2. Analizar os cambios fisiolóxicos desencadeados pola aplicación de xasmonatos e brasinoesteroides.

3. Comprobar se a relación establecida entre as dúas hormonas é sinérxica.

4. Metodoloxía.

4.1. Material biolóxico.

Os ensaios realizaranse co Tomate cv Moneymaker. As sementes cultivaranse nun substrato de vermiculita e regarase cunha solución nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). O segundo día despois da xerminación as plántulas serán transplantadas a un substrato composto por unha mestura de terra: vermiculita (3:1 v/v). Para regar utilizarase auga da billa. Durante todo o proceso as condicións de cultivo serán de 16 horas de luz a 25 °C e 8 horas de escuridade a 18 °C .

A cepa do fungo que se utilizará será a cepa B05.10 de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. cedida polo Dr. Jan van Kan (Wageningen University, Países Baixos).

4.2. Inoculación.

O inóculo obtense seguindo o procedemento descrito por Benito *et al.* (1998) e utilizado por Díaz *et al.* (2002). Os conidios suspenderanse a unha concentración de 10^6 conidios/mL no medio de cultivo Gamborg's B5 (Duchefa Biochemie bv, Haarlem, Países Baixos) suplementado con glucosa 10 mM e fosfato potásico 10 mM (pH 6). A suspensión será pre- incubada durante 2-3 horas sen axitación. A inoculación realizarase con gotas de 2 microlitros da suspensión na primeira e segunda das follas verdadeiras en plantas de tres semanas. Aplicarase 1 gota por foliolo.

4.3. Tratamento.

24 horas antes da inoculación, aplicaranse ás plantas os diferentes tratamentos. Para a indución coas hormonas utilizarase unha disolución de xasmonato de 10 μ M en dimetilsulfóxido:auga (1:10000 v/v), unha de brasinólido de 5 μ M en dimetilsulfóxido: auga (1:10000 v/v) e unha disolución coas dúas hormonas a unha concentración de 10 μ M de xasmonato e 5 μ M de brasinólido. Establecerase o control cunha disolución de dimetilsulfóxido en auga (1:10000 v/v). As concentracións de fitohormonas utilizadas en cada caso están baseadas en estudos realizados anteriormente no laboratorio de Fisioloxía Vexetal da Universidade da Coruña en pemento (datos non publicados).

Todos os tratamentos realizaranse mediante a pulverización das primeiras follas verdadeiras das plántulas. Cada tratamento aplicarase a 20 plantas, das que 10 serán inoculadas e 10 non o serán. Os experimentos serán realizados por triplicado de xeito independente.

4.4. Recollida e mantemento de mostras.

Para a cuantificación da colonización as mostras serán recollidas 72 horas despois da inoculación. No caso da actividade encimática as mostras serán recollidas en tres tempos: 0h (inoculación), 8h e 24h (a contar dende o momento da inoculación). Para a valoración da expresión xénica a recollida realizarase nos tempos 0h e 24h. Utilizaranse as follas sometidas a cada tratamento en plantas inoculadas e non inoculadas. As mostras serán pesadas, conxeladas en nitróxeno líquido e almacenadas a -80 °C.

4.5. Determinación de síntomas.

O segundo e o terceiro día despois da inoculación, cun calibre mediranse os diámetros das lesións nas follas inoculadas e calcularase a incidencia e a severidade.

A incidencia é a porcentaxe do número de lesións expandidas en relación co número total de inoculacións.

$$\text{Incidencia} = (\text{número de lesións} / \text{número de inoculacións}) \times 100$$

A severidade é a área da lesión.

$$\text{Área da lesión} = \pi \times (\text{diámetro da lesión} / 2)^2$$

4.6. Cuantificación da colonización con PCR en tempo real.

A cuantificación da colonización do fungo no hóspede determinarase cunha PCR cuantitativa en tempo real (qPCR) seguindo o método descrito por Vega *et al.* (2015). O DNA de mostras recollidas para cada tratamento será illado mediante a metodoloxía descrita por Edwards *et al.* (1991). A qPCR realizarase co seguinte programa: 95 °C 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos e 72 °C 30 segundos seguido dunha análise da curva de disociación de 55 a 95 °C. As reaccións da q-PCR realizaranse por triplicado usando SYBRGreen no SAI (Servizos de Apoio a Investigación da Universidade da Coruña).

Para establecer a curva de calibrado utilizaranse disolucións seriadas con DNA xenómico puro de cada especie (Gachon e Saindrenan, 2004). As secuencias dos cebadores utilizados inclúense na táboa 4.

Táboa 4. Cebadores utilizados para a qPCR. Modificado Vega *et al.* (2015)

Xene	Organismo	N.º de acceso	Secuencia	Referencia
Ubiquitina	Tomate	TC193502	Ubi-F GGACGGACGTAAGCTAGCTGAT	Lovdal e Lillo, 2009
			Ubi-R AGCTTTCGACCTCAAGGTA	
Cutinasa A	<i>B. cinerea</i>	Z69264	CG11-AGCCTTATGTCCCTCCCTTG	Gachon <i>et al.</i> , 2004
			CG12-GAAGAGAAATGGAAATGGTGAG	

4.7. Determinación da cantidade de H₂O₂ e O₂⁻.

A cantidade de H₂O₂ das mostras determinarase utilizando o método descrito por Velikova *et al.* (2002). 0,5 gramos de follas frescas serán homoxeneizadas con 0,5mL de ácido tricloracético (TCA) 0,1% (w/v) nun morteiro colocado nun baño de xeo. O homoxeneizado será centrifugado a 12.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. 0,5 mL do sobrenadante engadiranse a 0,5 mL de tampón de fosfato potásico (pH 7,0) 10 mM e 1 mL de KI 1M. A absorbancia determinarase a 390 nm. O contido de H₂O₂ expresarase en mmol/kg.

Para determinar cantidade de O₂⁻ utilizarase o método de Xu *et al.* (2006). 1 g de tecido será homoxeneizado con 2,5 mL de tampón fosfato frío (pH 7.8), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1mM e 2% PVPP (polivinilpolipirrolidona). O homoxeneizado será centrifugado a 17.000 x g durante 60 minutos a 4 °C. A 0,5 mL do sobrenadante obtido engadirase 1 mL de hidroxilamonio cloruro (1mM) que se manterá durante 1 hora a 25 °C. Para desenvolver a cor engadiranse 1 mL de ácido sulfanílico (17mM) e 1 mL de α-naftilamina (7 mM). A nova mestura incubarase durante 20 minutos a 25 °C. A absorbancia determinarase a 530 nm. A cantidade de O₂⁻ expresarase en μmol/kg.

As recollidas das follas frescas realizaranse no momento da inoculación (0h) e cada 2 horas durante as seguintes 8 horas (2h, 4h, 6h e 8h). As extraccións e medicións realizaranse coas mostras frescas.

4.8. Ensaio encimáticos.

4.8.1. Extracción e medida de proteínas totais.

Para a extracción e medida de proteínas totais seguirase a metodoloxía descrita por Cao *et al.* (2009). Utilizaranse 0,3 gramos das mostras que serán homoxeneizadas con 3mL de tampón HEPES 25 mM (pH 7,8), EDTA 0,2 mM, ascorbato 2 mM e 2% PVPP. O homoxeneizado centrifugarase a 4 °C durante 20 minutos a 12.000 x g e o sobrenadante separarase en alícuotas de 300 µL que se almacenarán a -80 °C. A medida de proteínas totais realizarase mediante o método Bradford (1976) usando albumina sérica bovina para obter a recta patrón.

4.8.2 Determinación da actividade das encimas antioxidantes; superóxido dismutasa (SOD), da catalasa (CAT) e da ascorbato peroxidasa (APX).

Para determinar a actividade das encimas antioxidantes utilizaranse as alícuotas de 300 µL obtidas no apartado anterior.

A actividade da superóxido dismutasa cuantificarase medindo a súa capacidade de inhibir a redución fotoquímica do nitro azul tetrazolio (Nitro-Blue-Tetrazolium, NBT) mediante o método descrito por Stewart e Bewley (1980). Para iso prepararanse 3mL de mestura de reacción con 50 mM de tampón fosfato (pH 7,8), metionina 13 mM, NBT 75 µM, EDTA 100 nM, 0-200µL do extracto da encima e riboflavina 2 µM. Os tubos coas mesturas serán axitados e posteriormente colocados baixo dous tubos fluorescentes de 15w a unha distancia de 30 cm. Para comezar a reacción acenderanse os tubos fluorescentes e manteranse acesos durante 10 minutos. Despois os tubos coas mostras serán tapados. A absorbancia medirase a 560nm. Unha unidade (U) de actividade da SOD é definida como o volume necesario de encima para inhibir ao 50% a reacción de redución do NBT. Os datos expresaranse en U/ mg de proteína.

Para determinar a actividade da catalasa utilizarase o método de Patra *et al.* (1978), baseado no estudo da degradación H₂O₂ medindo os cambios que causa na absorbancia a 240 nm. 5 mL de mestura de reacción conterán tampón fosfato 300 µM (pH 6,8), H₂O₂ 100 µM e 1 mL do extracto da encima. A mestura incubarase durante 1 minuto a 25 °C. Para parar a reacción engadirase 10 ml de ácido sulfúrico 2% (v/v). Os datos expresaranse en nkatal/mg de proteína. Un katal é a cantidade de encima que transforma 1 mol de substrato por segundo.

A actividade da ascorbato peroxidasa (APX) será medida en función do descenso da absorbancia a 290 nm causada pola oxidación do ascorbato (Nakano e Asada, 1981). A mestura de reacción (3 mL) conterán tampón fosfato 50 mM (pH 7), EDTA 0,2 mM, ácido ascórbico 0,5 mM, H₂O₂ (30%) 0,2 mM e 50 µL do extracto da encima. Os datos expresaranse en nkatales/mg de proteína.

4.9. Determinación da expresión dos xenes da superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa.

4.9.1. Extracción do RNA e obtención de cDNA.

A extracción do RNA das mostras realizarase usando TRIZOL (Invitrogen) seguindo as indicacións do fabricante. O DNA xenómico será eliminado seguindo o protocolo do kit RNeasy Mini Kit (Qiagen).

A síntese do cDNA realizarase cunha transcriptasa reversa-PCR (RT-PCR) partindo de 2 µg de RNA e co kit RevertAid™ first strand cDNA Synthesis (Fermentas, Lithuania). A reacción terá lugar no laboratorio de Fisioloxía Vexetal da UDC.

Os cebadores e o programa que se utilizarán foron descritos previamente por Li *et al.* (2012).

Táboa 5. Nome, número de acceso e secuencia dos cebadores. Nota: F: *forward primer* (sentido); R: *Reverse primer* (antisentido). Modificado de Li *et al.* (2012)

Xene	N.º Acceso	Cebadores
SOD	AF527880.1	F: ACTGGACTTGCTCCTGGACT R: CGCATGACGAATTTTCATCTC
CAT	AF112368.1	F: AGGAGAATTGGAGGGTCCTT R: TGTGAATGTGTGGACACCAG
APX	DQ096286.1	F: GACTCTTGGAGCCCATTAGG R: AGGGTGAAAGGGAACATCAG
<i>actina</i>	AB19931	F: TGGTCGGAATGGGACAGAAG R: CTCAGTCAGGAGAACAGGGT

4.9.2. q-PCR

cDNA obtido no apartado anterior será usado para a qPCR que se realizará no SAI.

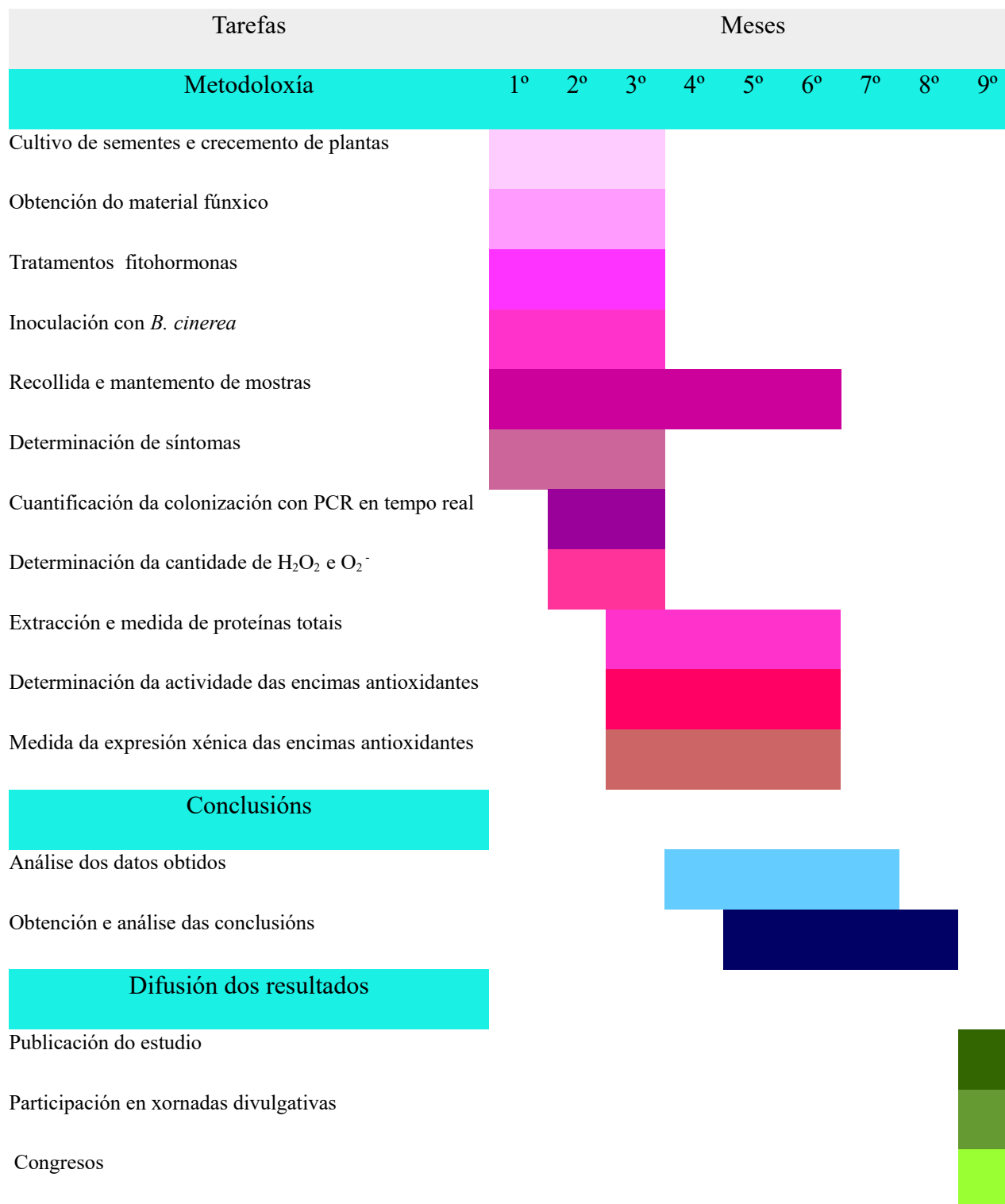
Cada reacción (20 μ L) conterá 10 μ L of iQ SYBRGreen Supermix, 1 μ L de cDNA diluído, e 0,1 μ mol dos cebadores.

A qPCR realizarase co programa indicado no apartado anterior (Li *et al.*, 2012). Na fase de 54 °C recolleranse os datos da fluorescencia. O xene da actina será usado como xene normalizador (*housekeeping gene*).

Todos os experimentos serán realizados por triplicado de xeito independente. O cDNA sintetizarase a partir de dúas mostras diferentes. A expresión relativa dos xenes será calculada seguindo o método de Livak e Schmittgen (2001).

5. Plan de traballo.

O proxecto desenvolverase ao longo de nove meses. O cronograma recolle a secuencia das tarefas programadas.



6. Cuestións éticas.

O desenvolvemento aquí presentado non vulnera ningún dos principios éticos e legais da ciencia. Non se traballa con material humano nin con datos que poidan afectar a privacidade dos pacientes. Non se traballa con animais ou con material orgánico ou xenético de países en desenvolvemento ou de especial protección. O presente traballo carece de usos militares ou potencialmente daniños.

Para evitar posibles contaminacións, todos os residuos patoxénicos serán esterilizados e destruídos.

7. Aplicabilidade.

A consecución dos obxectivos expostos no proxecto permitirá o deseño dun produto fitosanitario que reducirá os danos causados polo fungo patoxénico no cultivo de tomate cun impacto mínimo para o medio ambiente.

8. Plan para a difusión dos resultados.

Unha vez finalizado o proxecto, realizarase unha publicación na que se darán a coñecer os resultados e conclusións acadadas na revista *Plant Pathology* (factor de impacto: 2,303 Q1 en “*Agronomy*” do *Journal Citation Reports* (JCR)).

Por outra banda, a elaboración do material necesario para a asistencia a congresos como os organizados pola Sociedade Española de Fitopatoloxía está programada para o último mes do proxecto. Nese mesmo mes tamén se deseñarán os recursos necesarios para difundir os resultados e as posibles aplicacións en diferentes foros como xornadas, cursos e charlas cunha finalidade divulgativa e formativa. Todas estas actividades estarán destinadas a produtores de tomate.

9. Recursos necesarios.

O proxecto desenvolverase no laboratorio e dependencias da área de Fisioloxía Vexetal da Facultade de Ciencias da Universidade da Coruña. Os Servizos de Apoio a Investigación (SAI) serán utilizados para a realización das PCRs cuantitativas en tempo real. Unha estimación da infraestrutura e dos recursos necesarios co seu custe aproximado inclúese na táboa 6.

Táboa 6. Estimación de recursos necesarios e custo aproximado. A maioría dos prezos corresponden as tarifas do provedor Sigma-Aldrich ou foron proporcionados polo director do Traballo Fin de Mestrado. O precio do kit RNeasy Mini corresponde á tarifa de Quiagen. Os primers serán adquiridos en R. Costoya S.L. As tarifas do SAI obtivéronse da súa páxina web.

Recursos	Custo aproximado en euros
Recursos dispoñibles no laboratorio de Fisioloxía Vexetal	
Cámaras de cultivo	
Conxelador	
Espectrofotómetro	
Tubos fluorescentes	
Centrifugas	
Cámara de fluxo laminar	
Nevera	
Baño	
Calibre dixital	
Pulverizadores	
Micropipetas de varios volumes	
Morteiros de porcelana	
Probetas de varios volumes	
Vasos de precipitados de varios volumes	
Matraces de varios volumes	
Tubos centrífuga	
Tubos de ensaio	
Botellas vidro	
Bandexas para sementeira	
Servizos contratados (SAI)	
RT-PCR	*
q-PCR colonización	686,8
q-PCR expresión xénica	1381,68
Material biolóxico/reactivos/funxibles	
Sementes de tomate MoneyMaker	3,75
B05.10 de <i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr	
Substrato vermiculita	21,2
Substrato terra	19,7
Macetas (bandexas de 40 alveolos)	15,73
Medio de cultivo Gamborg's B5	8,5
Placas Petri	154,6
Potato Dextrose Agar	158
Metil- Xasmonato	36,5
Brasinólido	331
Dimetilsulfóxido (DMSO)	51,5
Ácido tricloroacético (TCA)	34,6
Ioduro potásico	54
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	72,5
Polivinilpirrolidona (PVPP)	198
Hidroxilamonio cloruro	272
Ácido sulfanílico	61
α -naftilamina	115,5
Tampón HEPES	106
Tampón fosfato	137
Ácido ascórbico	173
Albumina sérica bovina	681
Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT)	93,5
Metionina	125
Riboflavina	44,25
H ₂ O ₂	42,25
Ácido sulfúrico	180
TRIZOL	346
RNeasy Mini Kit (50)	272,45
RevertAid™ first strand cDNA Synthesis	318
Reactivo de Bradford	293
Primers	84,12
Eppendorf 1,5 ml	24
Papel aluminio	5
Puntas micropipeta varios volumes	120
Bolsa material contaminado	16,23
Papel Parafilm	20
Alcohol sanitario	21,6
Guantes desbotables	10,8
Outros gastos	
Inscripción e asistencia a congresos	1000
Inscripción e/ou asistencia a xomadas, cursos e charlas	500
Total estimado	8289,76
*Realízase no Laboratorio Fisioloxía Vexetal da UDC.	

10. Bibliografía.

Angulo, C.O., Leyva, M., Finiti, I., López-Cruz, J., Fernández-Crespo, E., García-Agustín, E. e González Bosch, C. (2015) Role of dioxygenase α -DOX2 and SA in basal response and in hexanoic acid-induced resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants against *Botrytis cinerea*. *J. Plant Physiol.* **175**, 163-173.

Belkhadir, Y., Jaillais, Y., Epplec, P., Balsemão-Pires, E., Jeffery, L.D. e Chory, J. (2011) Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 297-302.

Bjornson, M., Dandekar, A.M., Chory, J. e Dehesh, K. (2016) Brassinosteroid's multi-modular interaction with the general stress network customizes stimulus-specific responses in Arabidopsis, *Plant Sci.* **250**, 165-177.

Cao, Y., Zhang, Z., Xue, L., Du, J.B., Shang J., Xu, F., Yuan, S. e Lin H.H. (2014) Lack of salicylic acid in Arabidopsis protects plants against moderate salt stress. *Z. Naturforsch. C*, **64**, 231-238.

Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D. e Molina, A. (2013) Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front. Plant Sci.* **4**, 1-12.

Díaz, J., ten Have, A. e van Kan, A.L. (2002) The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **129**, 1341–1351.

FAOSTAT (2018) Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/QC/visualize> [consultado 4-6-2018]

Gachon, C. e Saindrenan, P. (2004) Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 367–371.

Goellner, K. e Conrath. U. (2008) Priming: it's all the world to induced disease resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* **121**, 233-242.

Hoagland, D.R. e Arnon, D.I. (1950) The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. *California Agricultural Experiment Station*, Circular-347.

- Edwards, K., Johnstone, C. e Thompson, C.** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1349.
- Eilenberg, J., Hajek, A. e Lomer, C.** (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* **46**, 387–400.
- Elad Y., Vivier M. e Fillinger S.** (2016) *Botrytis*, the Good, the Bad and the Ugly. En: Fillinger S., Elad Y. (eds.) *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Suiza: Springer International Publishing.
- Jacometti, M.A., Wratten, S.D. e Walter, M.** (2010) Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vine yards. *Aust. J. Grape Wine Res.* **16**, 154-172.
- Jiang, L. Jin, P., Wang, L., Yu, X., Wang, H. e Zheng, Y.** (2015) The effect of MeJA on ethylene biosynthesis and induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Sci. Horti.* **192**, 218-213.
- Li, J.M., Chen, S.C., Liu, A.R., Wang, Z.H., Liu, D.L., Wang, F.H. e Ahammed, G.J.** (2012) Combined effects of hypoxia and excess Mn²⁺ on oxidative stress and antioxidant enzymes in tomato seedlings. *Rus. J. Plant Physiol.* **59**, 670–678.
- Livak, K.J. e Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods*, **25**, 402–408.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación** (2008) Material Vegetal. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspxidFicha=2193#cd-search> [consultado 4-6-2018]
- Nafisi, M., Fimognari, L. e Sakuragi, Y.** (2015) Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry*, **112**, 63-71.
- Nakano Y. e Asada K.** (1981) Hydrogen peroxide scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiol.* **22**, 867 – 880.
- Patra H. L., Kar M., e Mishre D.** (1978) Catalase activity in leaves and cotyledons during plant development and senescence. *Biochem. Physiol.* **172**, 385 – 390.

- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., León-Reyes, A. y Van Wees, S.C.** (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 489-521.
- Song, L.X., Xu, X.C., Wang, F.N., Wang, Y., Xia, X.J., Shi, K. e Yu, J. Q.** (2017) Brassinosteroids act as a positive regulator for resistance against root knot nematode involving RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG-dependent activation of MAPKs in tomato. *Plant, Cell Environ.* **41**, 1113–1125.
- Spoel, S.H. e Dong, X.** (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 89-100.
- Stewart, R. C. e Bewley, J. D.** (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* **65**, 245 – 248.
- Thaler, J.S., Owen, B. e Higgins, V.J.** (2004) The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiol.* **135**, 530–538.
- Van Kan, J. A., Shaw, M.W. e Grant-Downton, R.T.** (2014) Botrytis species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue? *Mol. Plant Pathol.* **9**, 957-961.
- Van Kan, J. A.** (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* **11**, 247-253.
- Van Loon, L.C., Rep, M. e Pieterse, C.M.J.** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. of Phytopathol.* **44**, 135-162.
- Vega, A., Canessa, P., Hoppe, G., Retamal, I., Moyano, T. C., Canales J., Gutiérrez, R. A. e Rubilar, J.** (2015) Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to *Botrytis cinerea* in response to nitrogen availability in *Solanum lycopersicum*. *Front. Plant Sci.* **6**, 911.
- Velikova V., Yordanov I., e Edreva A.** (2002) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid raintreated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* **151**, 59 – 66.
- Veloso, J., García, T., Bernal, A. e Díaz, J.** (2014) New bricks on the wall of induced resistance: salicylic acid receptors and transgenerational priming. *Eur. J. Plant Pathol.* **138**, 685-693.

- Villa, F., Cappitelli, F., Cortesi, P. e Kunova, A.** (2017) Fungal Biofilms: Targets for the development of novel strategies in plant disease management. *Front. Microbiol.* **8**, 654.
- Walters, D.R. e Fountaine, J.M.** (2009) Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *J. Agric. Sci.* **147**, 523-535.
- Walters, D., Ratsep, J. e Havis, N.** (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J. Exp. Bot.* **64**, 1263–1280.
- Wang, K., Liao, Y., Kan, J., Han, L. e Zheng Y.** (2015) Response of direct or priming defense against *Botrytis cinerea* to methyl jasmonate treatment at different concentrations in grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* **194**, 32-39.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. e Van Kan, J.A.L.** (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 561-580.
- Xiao, C.L., Chandler, C.K., Price, J.F., Duval, J.R., Mertely, J.C. e Legard, D.E.** (2001) Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew strawberry in large plastic tunnel and field production systems. *Plant Dis.* **85**, 901-909.
- Xu, S., Li, J.L., Zhang, X.Q., Wei, H. e Cui, L.J.** (2006) Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environ. Exp. Bot.* **56**, 274–285.
- Yu, M., Shen, L., Fan, B., Zhao, D., Zheng, Y. e Sheng, J.** (2009) The effect of MeJA on ethylene biosynthesis and induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Postharvest Biol. Technol.* **54**, 153-158.
- Zhang D.-W., Deng X.-G., Fu F.-Q. E Lin H.H.** (2015) Induction of plant virus defense response by brassinosteroids and brassinosteroid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **4**, 875-885.