

Grao en Bioloxía

Memoria do traballo de Fin de Grao

Resistencia inducida por Bencilaminopurina en judía
frente a *Phytophthora capsici*: Enzimas defensivas

Resistencia inducida por Bencilaminopurina en feixón
frente a *Phytophthora capsici*: Enzimas defensivas

Induced resistance by Benzylaminopurine in bean against
Phytophthora capsici: Defense enzymes



M^a Verónica González Remuiñán

Curso: 2019-2020. Convocatoria: Febrero

Director 1: José Díaz Varela

Director 2: Lorena Almagro Romero

JOSÉ DÍAZ VARELA, PROFESOR TITULAR DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DEL DEPARTAMENTO DE BIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA y LORENA ALMAGRO ROMERO, PROFESORA AYUDANTE DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLÓGÍA VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

INFORMAN:

Que el presente Trabajo de Fin de Grado presentado por la alumna MARÍA VERÓNICA GONZÁLEZ REMUIÑÁN y titulado:

“Resistencia inducida por Bencilaminopurina en judía frente a *Phytophthora capsici*: Enzimas defensivas”

“Resistencia inducida por Bencilaminopurina en feixón fronte a *Phytophthora capsici*: Enzimas defensivas”

“Induced resistance by Benzylaminopurine in bean against *Phytophthora capsici*: Defense enzymes”

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

Y para que así conste, firman el presente informe a 19 de Febrero de 2020.

DIAZ VARELA
JOSE - DNI
32782379L

Firmado digitalmente por DIAZ VARELA
JOSE - DNI 32782379L
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
o=UNIVERSIDAD DE A CORUÑA,
ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE
EMPLEADO PUBLICO, ou=BIOLOXIA,
ou=1016, serialNumber=IDCES-32782379L,
sn=DIAZ VARELA, givenName=JOSE,
cn=DIAZ VARELA JOSE - DNI 32782379L
Fecha: 2020.02.19 09:41:41 +01'00'

José Díaz Varela

ALMAGRO
ROMERO
LORENA -
48505730H

Firmado digitalmente
por ALMAGRO ROMERO
LORENA - 48505730H
Fecha: 2020.02.19
09:37:39 +01'00'

Lorena Almagro Romero

Índice

Resumen	1
Resumo	1
Abstract	1
1. Introducción	3
1.1. Planta huésped: Judía (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	3
1.2. Patógeno: <i>Phytophthora capsici</i> Leon.	4
1.3. Citoquininas	10
1.3.1. Bencilaminopurina (BAP).....	12
2. Objetivos	12
3. Materiales y Métodos	12
3.1. Material vegetal.....	12
3.2. Material patógeno.....	13
3.3. Método de inducción.....	13
3.6. Extracción de proteínas y determinación de proteínas totales.....	14
3.7. Medida de la actividad peroxidasa	15
3.8. Medida de la actividad quitinasa	15
3.10. Análisis estadístico.....	16
4. Resultados	17
4.1. Actividad peroxidasa.....	17
4.2. Actividad quitinasa.....	17
4.3. Actividad glucanasa	18
5. Discusión.....	19
6. Conclusión.....	20
7. Bibliografía	20

Resumen

La judía (*Phaseolus vulgaris* L.) es una legumbre con unas amplias cualidades nutricionales, la principal fuente de proteínas vegetales y una planta de gran interés económico; por ello su cultivo se ha extendido por todo el mundo. La judía se ve expuesta a fitopatógenos que le causan múltiples enfermedades. Uno de estos fitopatógenos es *Phytophthora capsici*, que fue detectado por primera vez en una plantación de pimiento y ahora se sabe que afecta a más especies causando daños en los cultivos y grandes pérdidas económicas. En este trabajo se compara la actividad de tres enzimas defensivas (peroxidasa, quitinasa y glucanasa) entre diferentes tratamientos para comprobar si están implicadas en la resistencia frente al citado patógeno inducida por la aplicación exógena de Bencilaminopurina (BAP) sobre las hojas de judía. La BAP es una hormona vegetal involucrada en varios procesos fisiológicos y de desarrollo de las plantas. Analizados los datos de las actividades enzimáticas no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y, por lo tanto, se puede concluir que no están implicadas en la resistencia inducida por BAP.

Resumo

O feixón (*Phaseolus vulgaris* L.) é unha legume cunhas grandes calidades nutritivas, a principal fonte de proteínas vexetais e unha planta de gran interese económico; é por iso que o seu cultivo se estendeu por todo o mundo. O feixón está exposto a fitopatóxenos que causan múltiples enfermidades. Un destes fitopatóxenos é *Phytophthora capsici*, que se detectou por primeira vez nunha plantación de pementos e agora se sabe que afecta a máis especies causando danos nos cultivos e grandes perdas económicas. Neste traballo se compara a actividade de tres enzimas defensivas (peroxidasa, quitinasa e glucanasa) entre diferentes tratamentos para comprobar si están implicadas na resistencia fronte a o devandito patóxeno inducida pola aplicación esóxena de Bencilaminopurina (BAP) sobre as follas de feixón. A BAP é unha hormona vexetal involucrada en varios procesos fisiolóxicos e do desenvolvemento das plantas. Analizados os datos das actividades enzimáticas non se observaron diferenzas significativas entre os tratamentos e, polo tanto, pódese concluir que non están implicadas na resistencia inducida por BAP.

Abstract

The bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a legume with broad nutritional features, the main source of plant proteins and a plant of great economic interest; this is why this crop was spread worldwide. The vean is exposed to phytopathogens that cause multiple diseases. One of these phytopathogens is *Phytophthora capsici*, which was first detected in a pepper plantation, and it is now known to affect more species causing crop damage and large economic losses. In this work, the activity of

three defense enzymes (peroxidases, chitinases and glucanases) was compared among different treatments in order to test if they were involved in the resistance against the mentioned pathogen induced by the exogenous application of Benzylaminopurine (BAP) on the bean leaves. BAP is a plant hormone involved in various physiological and developmental plant processes. The analysis of the data of these enzyme activities showed no significant differences among the treatments, therefore we can conclude that they are non involved in the BAP induced resistance.

Palabras clave: actividad glucanasa; actividad peroxidasa; actividad quitinasa; bencilaminopurina; citoquinina; *Phaseolus vulgaris* L.; *Phytophthora capsici*.

1. Introducción

1.1. Planta huésped: Judía (*Phaseolus vulgaris* L.)

La planta huésped utilizada en este estudio es la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Fig.1.1.1) originaria de la región Mesoamericana y la región Andina. Su cultivo se extiende ahora por todo el mundo llegando a ser su principal productor Asia (Fig.1.1.2). En las últimas décadas se ha incrementado tanto el área cosechada como su producción (Fig.1.1.3).



Fig.1.1.1. *Phaseolus vulgaris* L. Imagen tomada de: <https://www.botanical-online.com/alimentos/judias-propiedades-caracteristicas>

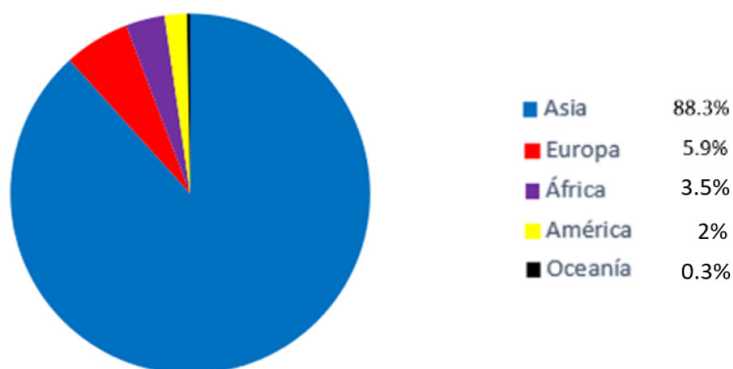


Fig.1.1.2. Producción de judía por continente en 2018. Imagen modificada de FAO, (2019) <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>

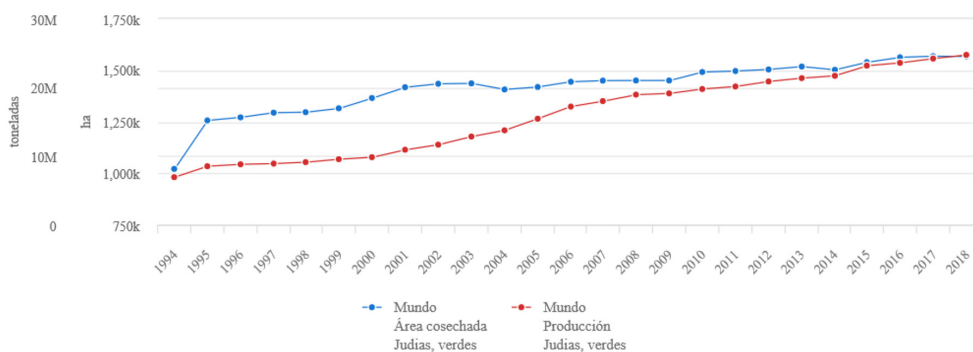


Fig.1.1.3. Área cosechada y producción de judías en el mundo desde 1994 hasta 2018. Imagen tomada de FAO, (2019) <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>

Se trata de una planta Fanerógama de la familia de las Fabáceas (o leguminosas) de cultivo anual (Díaz González *et al.*, 2004). Clasificación taxonómica: Reino: Plantae, División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Subclase: Rosidae, Orden: Fabales, Familia: Fabaceae, Subfamilia: Faboideae, Género: *Phaseolus*, Especie: *Phaseolus vulgaris* L.

Es una planta de gran interés económico que representa, junto con las demás legumbres, la principal fuente de proteínas vegetales y tiene completas cualidades nutricionales (Ocampo *et al.*, 2005; FAO, 2019). Las judías se ven expuestas a una gran variedad de enfermedades, como la causada por el patógeno *Phytophthora capsici*. Estas enfermedades causan importantes pérdidas de producción y económicas. Por este motivo se quiere conocer como le afecta a la judía dicho patógeno, como responde a él y como combatirlo o inducirle resistencia.

1.2. Patógeno: *Phytophthora capsici* Leon.

Este patógeno fue descrito por primera vez por Leon H. Leonian en 1922 tras su descubrimiento en plantaciones de pimiento (*Capsicum annum* L.) de una estación de investigación agrícola de Nuevo Méjico (Lamour *et al.*, 2012). Los organismos que tradicionalmente se consideraban hongos actualmente son ubicados en tres reinos distintos: Protista, Protozoa y Fungi. *Phytophthora capsici* se incluye en la clase Oomicetes y esta, a su vez, en el filo Oomicota dentro del grupo de los Heterocontófitos perteneciente al reino Protista (Tabla 1.2.1) (Cooke *et al.*, 2000).

Tabla 1.2.1 Clasificación filogenética de los Oomicetes de interés fitopatológico (Modificado de García-Jiménez *et al.*, 2010).

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
Protista	Oomycota	Oomycetes	Peronosporales	Peronosporaceae	Peronospora
					Pseudoperonospora
			Pythiales	Pythiaceae	Plasmopara
					Bremia
					Pythium
					Phytophthora
					Halophytophthora

Por otro lado, estudios posteriores dividen las especies de *Phytophthora* en 10 clados, donde *Phytophthora capsici* se encuentra en el clado 2 (Blair *et al.*, 2008).

Tanto los hongos verdaderos como los Oomicetos conforman un importante grupo de patógenos para las plantas, pero el género *Phytophthora* y los demás Oomicetos tienen unas características que distan de las de los hongos verdaderos estando incluso más cercanos a las algas de la división

Heterokontophyta que a estos, pues estudios genéticos y bioquímicos así lo demuestran (Piccini *et al.*, 2018). Las principales características diferenciales de los Oomicetos son: la formación de zoosporas biflageladas heterocontas (un flagelo liso y otro barbulado) en el interior de esporangios; la posesión de hifas cenocíticas y paredes celulares con celulosa, glucano y quitina; tienen una reproducción sexual por contacto gametangial; su meiosis es gametangial y sus ciclos de vida son monogenéticos diplofásicos (Díaz *et al.*, 2004; García-Jiménez *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2019). Por su parte, los hongos verdaderos tienen paredes celulares compuestas principalmente por quitina, quitosano y, en muchos casos, glucano (García-Jiménez *et al.*, 2010).

Hasta ahora se desconocía la existencia de quitina en las paredes celulares de los Oomicetos pero recientemente se ha demostrado su presencia, concretamente en *Aphanomyces spp.* y *Saprolegnia spp.* La quitina también está presente en ciertas etapas de desarrollo de *Phytophthora*, como las zoosporas y esporangios liberados (Cheng *et al.*, 2019).

Phytophthora capsici es un patógeno muy dinámico y destructivo de las hortalizas. Ataca a las cucurbitáceas, solanáceas y leguminosas, especialmente a las dos primeras (Tabla 1.2.2) (Lamour *et al.*, 2012; Hausbeck y Lamour, 2004; Cheng *et al.*, 2019; Reis *et al.*, 2018; Abeysekara *et al.*, 2019). Causa graves daños y sus síntomas varían en función del tipo de huésped, la parte de la planta infectada y las condiciones ambientales en las que se encuentren (Barchenger *et al.*, 2018). Estos síntomas son: la marchitez de las plántulas; la pudrición de la raíz, el tallo, el fruto y las semillas; en el caso de las judías se produce la necrosis del tallo y la pudrición de la vaina (Roberts y Kucharek, 2018; Lamour *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2019; Abeysekara *et al.*, 2019). En cuanto a las condiciones ambientales, si la lluvia es abundante se ve afectada toda la planta (Lamour *et al.*, 2012).

Tabla 1.2.2. Algunos cultivos susceptibles a *Phytophthora capsici* en condiciones de campo (Modificado de Hausbeck y Lamour, 2004).

Cucurbitaceae	Solanaceae	Leguminosae
Melón	Pimiento	Judía
Pepino	Berenjena	Haba
Calabaza	Tomate	
Calabacín		
Sandía		

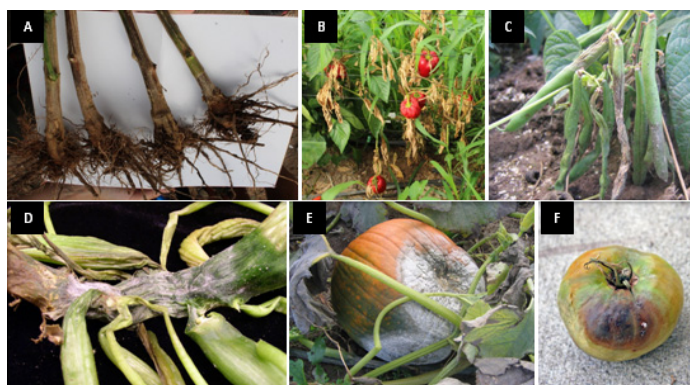


Fig.1.2.1. Síntomas causados por *Phytophthora capsici* en diferentes huéspedes. (A) Necrosis de los tallos y las raíces en pimiento. (B) Marchitamiento total de una planta adulta de pimiento. (C) Pudrición en vainas de judía. (D) Pudrición de la base de la planta de calabaza. (E) Pudrición en el fruto de calabaza. (C,D,E) con lesiones cubiertas por las estructuras reproductivas del patógeno. (F) Síntomas de la enfermedad en el fruto de tomate. Imágenes (A,B) tomadas de AgriSolver (<https://www.agrisolver.com/blog/la-marchitez-del-chile-manejo-integrado-de-phytophthora-capsici>), (C,D,E,F) tomadas de Cornell University (<http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html>).

La distribución de *Phytophthora capsici* a nivel mundial es muy amplia, encontrándose en numerosos países entre los que está España, incluido el noroeste peninsular (Galicia) (Fig.1.2.2) (Silvar *et al.*, 2006).

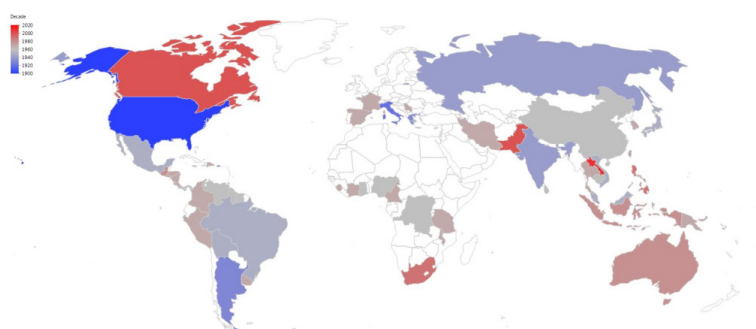


Fig.1.2.2. Distribución de *Phytophthora capsici* en el año 2017. Imagen tomada de Barchenger *et al.* (2018).

Phytophthora capsici tiene un ciclo de reproducción con una fase sexual y otra asexual, lo que hace más complicado aún controlar la enfermedad (Lamour *et al.*, 2012). En torno a la mitad de las especies reconocidas en el género *Phytophthora* son autofértiles (u homotáticas), y tan solo una de estas es capaz de completar la etapa sexual y formar oosporas. La otra mitad de las especies, entre las que se encuentra *Phytophthora capsici*, son heterotáticas y necesitan de dos tipos de compatibilidad denominados A1 y A2 para llevar a cabo su reproducción (Tyler 2002; Lamour *et al.*, 2012; Hausbeck y Lamour, 2004; Abeysekara *et al.*, 2019). Si estos dos tipos A1 y A2 están cerca y sus micelios se tocan se forman los gametangios masculinos (anteridios) y femeninos (oogonios) (Hausbeck y Lamour, 2004; Lamour *et al.*, 2012). Estos gametangios se fusionan para formar unas oosporas diploides de pared gruesa (Fig.1.2.3A), que son capaces de permanecer viables en el suelo durante más de 5 años incluso en condiciones ambientales adversas (Lamour *et al.*, 2012; Abeysekara *et al.*, 2019). Las oosporas necesitan un periodo de latencia generalmente

superior a 8 semanas para germinar (Fig.1.2.3B) y producir micelio sexualmente viable. Pasado este periodo se puede estimular la germinación de las esporas mediante el uso de tratamientos químicos o el daño mecánico (o una mezcla). Al germinar las esporas producen tubos germinativos que se ramifican en micelios típicos y/o producen esporangios en pedicelos largos (Fig.1.2.3C) (Lamour *et al.*, 2012; Jiménez-Díaz y Zabalgogea, 2010).

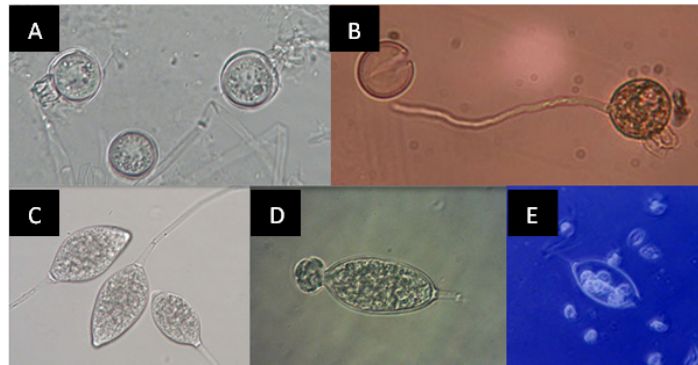


Fig. 1.2.3. Estructuras reproductoras de *Phytophthora capsici*. (A) Oosporas. (B) Oospora que comienza a germinar. (C) Esporangios. (D) Esporangio que comienza a liberar zoosporas de su interior. (E) Esporangio con zoosporas en su interior. Imagen tomada de Cornell University (<http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html>).

La reproducción asexual tiene lugar cuando las condiciones ambientales son favorables, y bajo las cuales *Phytophthora capsici* produce una gran cantidad de esporangios (Fig.1.2.3 C,E) sobre el tejido afectado. En los esporangios se forman las zoosporas biflageladas que son liberadas al medio (Fig.1.2.3 D,E y Fig. 1.2.4.) cuando llueve o se riega, y se dirigen a la planta quimiotácticamente hacia arriba (geotropismo negativo) (Lamour *et al.*, 2012). Tanto en *Phytophthora* spp. como en *Pythium* spp. la quimiotaxis podría ser una respuesta inespecífica a determinados aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, arginina y metionina). Pero cerca de las raíces esta quimiotaxis de las zoosporas se produce por campos eléctricos generados por las propias raíces como consecuencia del transporte iónico en su superficie, y dichas zoosporas se dirigen a zonas anódicas o catódicas. La quimiotaxis termina con el enquistamiento de la zoospora, su adherencia a la superficie vegetal, y la producción de un tubo germinal. El enquistamiento produce cambios en la estructura de la zoospora (separación o retracción de los flagelos, adopción de morfología esférica, rápida formación de pared celular, redistribución desordenada de orgánulos celulares en el citoplasma). El material adhesivo se constituye principalmente de glucoproteínas de alto peso molecular, y se almacena en vesículas citoplasmáticas en la zoospora desde donde se libera para recubrir el quiste en formación (Jiménez- Díaz y Zabalgogea, 2010). El tubo germinal, ayudado por enzimas secretadas, puede penetrar directamente en la cutícula de la planta y colonizar los tejidos del huésped (Feng *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Lamour *et al.*, 2012). A veces se observan apresorios en la zona de infección, estructuras especializadas para la invasión del tejido vegetal y la adherencia a la superficie de dicho tejido vegetal (Jiménez-Díaz y Zabalgogea, 2010; Lamour

et al., 2012). *Phytophthora capsici* también infecta los frutos o las hojas de la planta; y la penetración en las hojas es directa o a través de estomas (Hausbeck y Lamour, 2004).

El crecimiento de *Phytophthora capsici* se puede dar con temperaturas de entre 7 y 37 °C, pero el rango óptimo para que se produzcan las zoosporas y la infección es 27-32 °C (Fig.1.2.4). Bajo condiciones favorables (27-32 °C y alta humedad relativa) solo pasan 2-3 días entre la infección y la esporulación, con lo que el patógeno puede infectar en pocos días campos enteros de cultivo (Roberts y Kucharek, 2018; Lamour *et al.*, 2012; Hausbeck y Lamour, 2004).

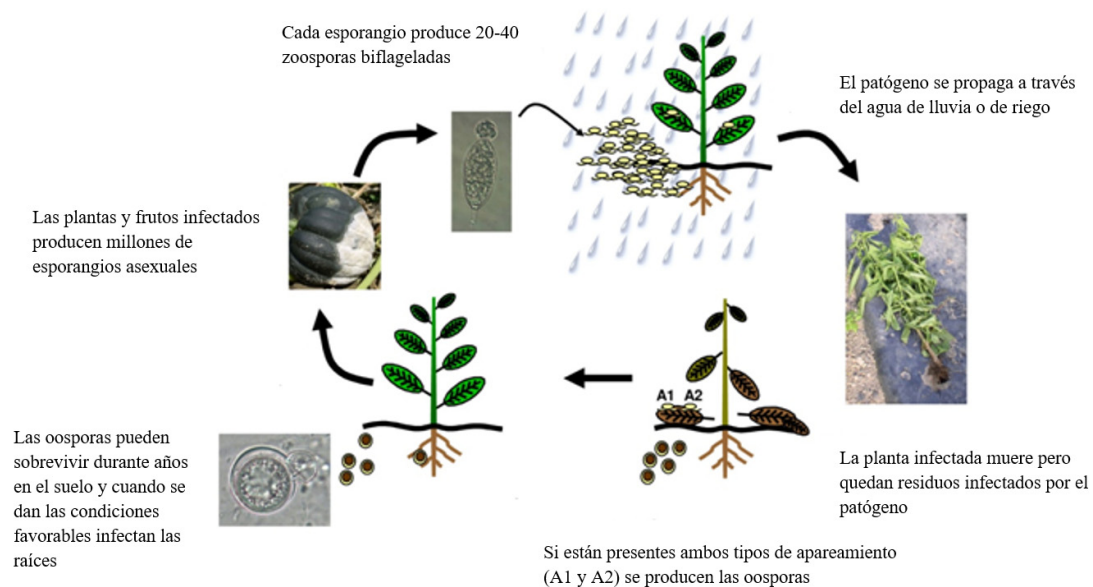


Fig. 1.2.4. Ciclo de vida de *Phytophthora capsici*. Imagen modificada de Cornell University (<http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html>).

Debido a su forma de infección y colonización, *Phytophthora capsici* es considerado un organismo hemibiotrófico (Lamour *et al.*, 2012; Abeyssekara *et al.*, 2019). Los organismos hemibiotróficos presentan una primera fase de crecimiento periplásmico y biotrófico con hifas que invaden las células, y una segunda fase con hifas secundarias que necrosan los tejidos incluso antes de invadirlos (Jiménez-Díaz y Zabalgogezcoa, 2010). De este modo, con el patógeno *Phytophthora capsici* en su primera fase de crecimiento la planta huésped no parece afectada; sin embargo, en la segunda fase ya se muestran signos de infección. Es en este momento cuando se comporta como un necrótrofo. Aparecen los esporangios, se dispersan las zoosporas y se inicia un nuevo ciclo infeccioso (Lamour *et al.*, 2012). Es precisamente la biotrófica, la fase problemática para los agricultores, puesto que si en el momento de cosechar todavía no hay signos de infección recolectan su cosecha y pasado un tiempo es cuando se manifiestan (Lamour *et al.*, 2012; Hausbeck y Lamour, 2004)

generándoles grandes pérdidas. Por este motivo es necesario encontrar métodos de control de esta enfermedad.

Una vez que *Phytophthora capsici* se ha establecido en un cultivo es muy difícil de controlar por la falta de resistencia duradera a este patógeno en cultivos comerciales y que en muchos casos la obtención de esta resistencia es difícil. Mayoritariamente las estrategias de control van encaminadas a reducir las pérdidas de cultivo limitando el agua disponible; lo que se consigue mediante el uso de una serie de técnicas para su siembra: suelos bien drenados, lechos elevados, uso de riego por goteo y, si es posible el crecimiento en enrejado. Pero no existen estrategias cuando las condiciones ambientales son cálidas y húmedas (Lamour *et al.*, 2012). En la última década se han realizado múltiples estudios enfocados a crear mejores estrategias para el control de patógenos basadas en una resistencia inducida (Walters *et al.*, 2013). La resistencia se puede inducir en las plantas a nivel local o sistémico. Su ventaja es que las plantas quedan inmunes a una amplia gama de patógenos. Aunque esta protección no sea completa sí se reduce el tamaño y/o número de lesiones. Este tipo de resistencia se puede inducir en la planta mediante una amplia gama de agentes bióticos (microorganismos) o abióticos (Díaz *et al.*, 2005; Walters *et al.*, 2013). La resistencia inducida se divide en dos tipos principales: Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y Resistencia Sistémica Inducida (ISR) (Walters *et al.*, 2013).

La Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) está asociada a las respuestas inducidas por varios agentes incluidos los patógenos necrotizantes y ciertos productos químicos; que le confieren a la planta una resistencia general a gran cantidad de posibles enfermedades posteriores causadas por patógenos biótrosos (Nuez *et al.*, 2004; Walters *et al.*, 2013; Veloso *et al.*, 2013; Shine *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Para que se desencadene dicha respuesta es esencial que un patógeno provoque una primera lesión necrótica (Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007; Walters *et al.*, 2013; Vallad y Goodman, 2004). La SAR está mediada por un proceso dependiente del ácido salicílico (Veloso *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2019) y se expresa a nivel local y sistémico.

El estímulo SAR se transmite a la progenie por un fenómeno de *Priming* transgeneracional dependiente de la señal de ácido salicílico (Veloso *et al.*, 2013; Shine *et al.*, 2017). Esta señalización se basa en la proteína NPR1. La presencia de ácido salicílico desencadena una muerte celular programada que, junto con la acción directa de dicho ácido, activaría la expresión de genes de defensa como los que codifican para proteínas relacionadas con la defensa ($\beta(1,3)$ -glucanasas, quitinasas y peroxidasas, entre otras). Además de esta respuesta de defensa directa, las plantas pueden entrar en un estado de sensibilidad en el que responden más rápido y fuerte ante una infección por patógenos o cualquier otro tipo de estrés. Este estado de sensibilidad sería el conocido

como *Priming*. Gracias a este *Priming* las plantas adquieren resistencia incluso a bajos niveles de estrés y responden a él de la misma manera que sus padres. Esta transmisión a la progenie de la resistencia inducida se demostró inicialmente en interacciones entre *Arabidopsis* y bacterias u Oomicetos, pero tiene lugar en más interacciones con plantas y patógenos. Incluso algún estudio confirmó su transmisión después de una generación libre de estrés (Veloso *et al.*, 2013).

La Resistencia Sistémica Inducida (ISR) es otro tipo de respuesta generalizada desencadenada por la colonización de las raíces por microbios beneficiosos como las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPR) (Vallad y Goodman, 2004; Walters *et al.*, 2013; Nuez *et al.*, 2004; Shine *et al.*, 2017; Ashajyothi *et al.*, 2020). Las PGPR más estudiadas son algunas especies de *Pseudomonas* que no generan daños aparentes en las raíces de las plantas (Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007; Haney *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017). La ISR está mediada por una ruta regulada por las fitohormonas jasmonato y etileno, pero es independiente del ácido salicílico y no se asocia con la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (Vallad y Goodman, 2004; Walters *et al.*, 2013; Nuez *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2019). Entre los genes implicados en ISR destaca el gen NPR1 que, como en el caso de SAR, parece tener un papel esencial en el tipo de resistencia activada en la ISR (Nuez *et al.*, 2004; Romera *et al.*, 2019).

1.3. Citoquininas

Las citoquininas son un grupo de hormonas vegetales que regulan varios procesos fisiológicos y de desarrollo de las plantas como pueden ser: respuestas frente al estrés, interacciones con patógenos (Buchanan *et al.*, 2015), división y diferenciación celular, senescencia de las hojas, movilización de nutrientes, desarrollo floral, entre otros (Kieber y Schaller, 2002; Joshi *et al.*, 2017; Cortleven *et al.*, 2018; Höning *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020); median en aspectos del desarrollo regulados por la luz y regulan procesos celulares como la citocinesis constituyendo un factor clave para controlar la división celular en el crecimiento y desarrollo (Taiz *et al.*, 2015; GroBkinsky *et al.*, 2011; Rey-Casal, 2016).

Hay dos tipos de citoquininas: las naturales (sintetizadas por plantas) y las sintéticas (Rey-Casal, 2016). Las naturales son compuestos derivados de la aminopurina que presentan un sustituyente de naturaleza aromática o isoprenoide que se encuentra en la posición 6 del anillo de purina (Joshi *et al.*, 2017; Höning *et al.*, 2018). Atendiendo a la naturaleza química de estos sustituyentes las citoquininas naturales se clasifican en dos grupos: aromáticas e isoprenoides (Pardiño-Orol, 2016; Höning *et al.*, 2018). Las citoquininas aromáticas, descritas en pocas especies, (p.ej. *Arabidopsis*) incluyen la orto-topolina, la meta-topolina, la benciladenina hidroxilada (bencilaminopurina, BAP, Fig.1.3.1.1), la orto-metoxitopolina y la meta-metoxitopolina (Buchanan *et al.*, 2015; Höning *et al.*,

2018). Las citoquininas isoprenoides, que se sintetizan a partir de derivados del isopreno (Cotelo-Morales, 2016) y del ATP/ADP principalmente en plastidios (Taiz *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2019), contienen la isopenteniladenina, la trans-zeatina, la cis-zeatina y la dihidrozeatina (Buchanan *et al.*, 2015; Höning *et al.*, 2018; Spallek *et al.*, 2018), siendo las más abundantes en las plantas (Pardiño Orol, 2016; Kieber y Schaller, 2018).

Además de estas bases libres (las únicas formas activas), las citoquininas también están presentes en las plantas en formas inactivas (Kieber y Schaller, 2018) como ribósidos, ribótidos o glucósidos (Buchanan *et al.*, 2015; Taiz *et al.*, 2018).

Las citoquininas están involucradas en la interacción huésped-patógeno (Rey-Casal, 2016). Se ha descrito que proporcionan a las plantas resistencia frente a virus, herbívoros y patógenos necrotizantes (Naseem *et al.*, 2015).

Estas fitohormonas son importantes en la coordinación de los genes que regulan el envejecimiento celular en la planta (Höning *et al.*, 2018). Muchos patógenos microbianos producen citoquininas que controlan las defensas de la planta huésped y, además, se ha comprobado que para varios de ellos son esenciales a la hora de llevar a cabo la infección (Spallek *et al.*, 2018). Los patógenos biotróficos inducen en las plantas un aumento de producción de citoquininas ya que necesitan que sus células sigan vivas. *Phytophthora capsici* es un patógeno hemibiótrofo y en una primera fase actúa como un biótrofo.

Las citoquininas aumentan la resistencia de la planta a los patógenos mediante señales de defensa (Rey-Casal, 2016; Sørensen *et al.*, 2017). Pero, a pesar de esto, la función de regulación de las citoquininas no está del todo claro. Hay estudios que demuestran que el aumento del nivel de citoquininas en plantas favorece su resistencia y otros en los que ocurre al contrario (Cotelo-Morales, 2016). Un ejemplo de esto lo encontramos en dos estudios realizados con *Arabidopsis*; en uno la aplicación exógena de *trans*-zeatina aumenta la inmunidad innata y en otro la atenúa. Por otro lado, y también en *Arabidopsis*, la sobreexpresión de los genes de la enzima isopenteniltransferasa (implicada en la biosíntesis de citoquininas) producen un aumento de la resistencia, mientras que la sobreexpresión de los genes de la enzima citoquinina oxidasa (implicada en el catabolismo de citoquininas) aumentan su susceptibilidad (Naseem *et al.*, 2015). En general, la actividad de las citoquininas es diferente en función del tipo de planta o tejido, y de las condiciones ambientales de desarrollo (Spallek *et al.*, 2018).

1.3.1. Bencilaminopurina (BAP)

Como se mencionó anteriormente la BAP (Fig. 1.3.1.1) pertenece a las hormonas del grupo de las citoquininas. El efecto de la BAP sobre *Phytophthora* ha sido estudiado en trabajos anteriores. Pardiño-Orol (2016) comprobó que la aplicación exógena de BAP indujo resistencia (local y sistémica) en judía (*Phaseolus vulgaris* L.) frente a *Phytophthora capsici* provocando la disminución de los síntomas. Cotelo-Morales (2016) también demostró que la aplicación externa de BAP a judía frente a *Botrytis cinerea* provocó una reducción del área de tejido afectado; y además esta aplicación de BAP en presencia del hongo incrementaba la actividad peroxidasa, indicando una posible resistencia inducida.

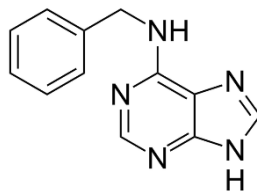


Fig. 1.3.1.1. Molécula de bencilaminopurina (BAP). Imagen tomada de Wikipedia (<https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Benzylaminopurine.svg>).

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es comprobar si la aplicación externa de la BAP sobre las hojas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) produce un aumento en las actividades enzimáticas peroxidasa, quitinasa y glucanasa, lo que explicaría en parte la resistencia inducida por BAP observada por Pardiño-Orol (2016) frente a *Phytophthora capsici*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal

Para la obtención de las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. (cultivar Helda) se sembraron semillas comerciales de esta planta en bandejas de plástico que contenían perlita regada con solución nutritiva (Pardiño-Orol, 2016). Las plantas crecieron durante 7 días bajo condiciones controladas de temperatura y luz (16 h de luz a 25°C y 8 h de oscuridad a 18°C) (Fig.3.1.1A). Transcurrido ese tiempo se trasladaron a macetas que contenían una mezcla de sustrato para plantas y perlita (proporción 3:1 v/v) y permanecieron durante 3 días bajo las mismas condiciones de fotoperiodo. A continuación, se aplicó el tratamiento con BAP (Fig.3.1.1B).



Fig. 3.1.1. *Phaseolus vulgaris* L. (A) Plántulas crecidas en perlita en presencia de solución nutritiva. (B) Plantas crecidas en pocillos con sustrato para plantas y perlita.

3.2. Material patógeno

Para la obtención del patógeno utilicé un aislado de *Phytophthora capsici* (Pc450) proporcionado por el Dr. Franck Panabières (INRA, Francia). Se realizó un cultivo del oomiceto durante una semana a temperatura ambiente en placas de Petri con medio PDA (Agar Dextrosa Patata) (Fig.3.2.1A). Transcurrido ese tiempo se obtuvieron varios discos del cultivo de un diámetro de 9mm utilizando un sacabocados (Fig.3.2.1B). Estos discos se utilizaron para la inoculación de las plantas.

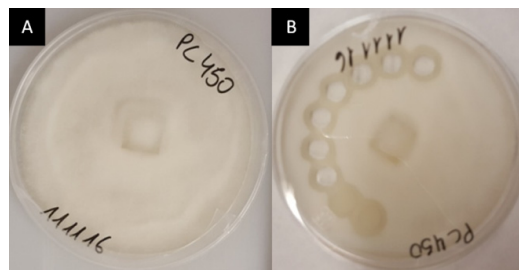


Fig. 3.2.1. (A) Cultivo del hongo *Phytophthora capsici* Pc450 en placa Petri con medio PDA. (B) Discos de cultivo del hongo *Phytophthora capsici* de 9 mm de diámetro.

3.3. Método de inducción

La inducción se realizó 3 días después de haber realizado el trasplante de las plantas a las macetas, dejando así que se desarrollasen bien las hojas de *Phaseolus vulgaris* L. (Fig.3.1.1B). Para realizar la inducción se hicieron dos grupos con 6 plantas cada uno colocadas en dos bandejas, diferenciadas como control e inducidas respectivamente. A las plantas del grupo control se le aplicó mediante pulverización manual 10 ml de una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,05% por hoja (aplicándola tanto en el haz como en el envés). Al grupo de plantas inducidas se les aplicaron 10ml de una disolución de bencilaminopurina (BAP) 50 μ M en 0,05% de DMSO.

3.4. Método de inoculación

Transcurridas 24 h tras la inducción con BAP, se inocularon las plantas con los discos del cultivo de *Phytophthora capsici*. Para ello, se colocaron dos discos de forma simétrica en el haz de cada

hoja (Fig.3.4.1), tanto del grupo control como del inducido. La inoculación solo se realizó en la mitad de las plantas correspondientes a cada grupo (control e inducido); es decir, 3 plantas del grupo control e inducido serán inoculadas y las otras 3 plantas no.

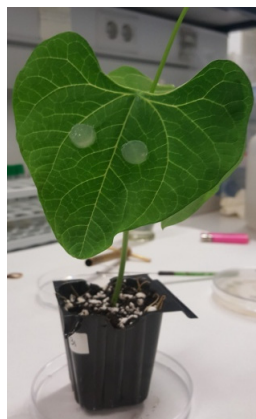


Fig. 3.4.1. Planta de *Phaseolus vulgaris* L. inoculada con los discos del hongo patógeno *Phytophthora capsici*.

A continuación, se separan las plantas en 2 grupos, una que contenía las plantas procedentes del grupo control e inducido sin inoculación y otra que contenía las plantas del grupo control e inducido inoculadas con *Phytophthora capsici*. Estas plantas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura y luz (16 h de luz a 25°C y 8 h de oscuridad a 18°C) y una humedad relativa alta para favorecer el crecimiento del patógeno.

3.5. Toma de muestras

Para la recogida de muestras se cortó 1 hoja de cada planta por grupos, obteniéndose varios paquetes de muestras: 2 paquetes de 3 hojas para cada grupo: grupo control inoculadas, grupo control no inoculadas, grupo inducidas e inoculadas y grupo inducidas y no inoculadas (Fig.3.5.1). Una vez empaquetadas las muestras se almacenaron a -80°C hasta la extracción de proteínas.



Fig. 3.5.1. (A) Paquetes de hojas sin inoculación. (B) Paquetes de hojas con inoculación. (C) Paquetes de muestras.

3.6. Extracción de proteínas y determinación de proteínas totales

Para llevar a cabo la extracción enzimática, se homogeneizaron las muestras en un mortero (en un baño de hielo) con tampón Tris HCl 50 mM a pH 7,5 y 0,5 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP)

por cada 10 g de tejido fresco. El extracto obtenido fue centrifugado a 12857 xg a 4°C durante 20 min. De ahí se tomó el sobrenadante que fue desalado a través de una columna PD-10 Sephadex G-25 (GE Healthcare) (Fig.3.6.1). Estas muestras desaladas son las que se utilizaron para la determinación de las actividades enzimáticas y el contenido total de proteínas. Se repartieron las muestras desaladas en alícuotas de 1 ml y se congelaron a -80°C hasta el momento se realizar las medidas enzimáticas.



Fig. 3.6.1. Columnas PD-10 Sephadex G-25 (GE Healthcare).

La medida de proteínas totales se realizó mediante el método colorimétrico de Stosc y se usó la albúmina de suero bovino como estándar para valorar la concentración total de proteínas en base a una recta patrón. La mezcla de la reacción consistió en: 900 μ l de reactivo de Bradford comercial, 50 μ l de una solución de NaOH (1M), 10 μ l de muestra y 40 μ l de agua destilada. Se agitaron las muestras y se dejaron reaccionar en oscuridad durante 10 min. Pasado ese tiempo se realizó una lectura de la absorbancia a 590 nm. Con los valores de absorbancia obtenidos a partir de las diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (0-20 μ g) se realizó una recta patrón. Se obtuvo una ecuación de la recta por regresión lineal y a partir de ella se calculó la concentración de proteínas totales de los extractos proteicos extraídos de las hojas de *Phaseolus vulgaris* L.

3.7. Medida de la actividad peroxidasa

Tras descongelar las alícuotas, se centrifugaron a 16060 xg durante 1 min y se usó el sobrenadante para medir las actividades enzimáticas. Se usó como sustrato el 4-metoxinaftol. La mezcla de la reacción consistió en: 890 μ l de tampón Tris-HCl 50mM a pH 7,5, 50 μ l de 4-metoxinaftol (100 mM), 50 μ l de H₂O₂ (6,6 mM) y 10 μ l de la muestra y se monitorizó el incremento de absorbancia a 593 nm. Las unidades de expresión de la actividad fueron mU/mg de proteína.

3.8. Medida de la actividad quitinasa

Para cuantificar la actividad quitinasa se usó como sustrato el glicol-quitina. La mezcla de la reacción consistió en: glicol-quitina al 1%, acetato de sodio (100 mM) a pH 5,0 y 85 μ l de la muestra.

Dicha mezcla se incubó a 37°C durante 10 min y después se pasó a hielo durante otros 10 min. Transcurrido ese tiempo, se añadió ferricianuro potásico (15 mM) disuelto en una solución de 0,5 M de carbonato de sodio y se hirvió durante 15 min. Se midió la absorbancia a 420 nm. Se realizó una curva de calibrado con N-acetil-glucosamina para cuantificar la actividad quitinasa. Las unidades de expresión de la actividad fueron mU/mg de proteína.

3.9. Medida de la actividad glucanasa

Para cuantificar la actividad β -1,3-glucanasa se usó como sustrato la laminarina y se siguió el mismo procedimiento descrito para la actividad quitinasa. La mezcla de la reacción consistió en: laminarina al 1%, acetato de sodio (100 mM) a pH 5,0 y 85 μ l de la muestra. Al igual que en el caso anterior, dicha mezcla se incubó primero a 37 °C durante 10 min y después se pasó a hielo durante otros 10 min. Transcurrido ese tiempo se añadió ferricianuro potásico (15 mM) disuelto en carbonato de sodio (0,5 M) y se hirvió durante 15 min. Se midió la absorbancia a 420 nm. Se realizó una curva de calibrado con N-acetil-glucosamina para cuantificar la actividad β -1,3-glucanasa. La actividad glucanasa también se midió en mU/mg de proteína.

3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics Centurion XVIII para Windows. Mediante una ANOVA de 2 vías se han comparado las diferencias entre 1) tratamientos control y BAP y 2) inoculado/no inoculado, así como también sus interacciones. El nivel de significación que se ha aplicado es de $\alpha = 0,05$.

4. Resultados

4.1. Actividad peroxidasa

Los resultados derivados de las medidas de actividad peroxidasa mostraron que existe un ligero incremento de esta actividad en el tratamiento control inoculado con el patógeno (Fig. 4.1). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos control y BAP y entre los inoculados o no inoculados, ni interacción entre tratamientos con un 95 % de nivel de confianza. De hecho, al aplicar el test estadístico ANOVA se obtuvieron p-valor superiores a 0,05 en todos los casos (p-valor para control/BAP= 0,6222, p-valor para inoculado/no inoculado= 0,3910, p-valor para la interacción entre ellos= 0,5662). Estos resultados indican que la aplicación de BAP a las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. no incrementa la resistencia de esta planta al patógeno *Phytophthora capsici* mediante un incremento de la actividad peroxidasa.

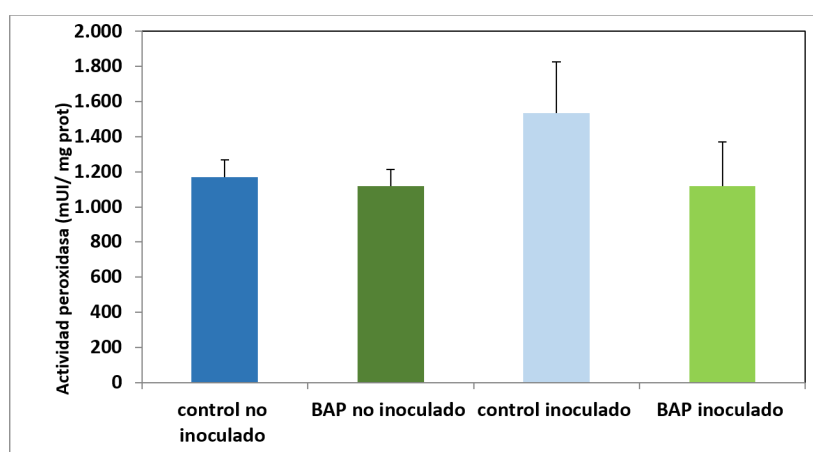


Fig. 4.1. Medidas de la actividad peroxidasa en las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. control e inducidas con BAP, en presencia o ausencia de *Phytophthora capsici*. Los datos son la media más el error estándar de tres experimentos independientes (n=3).

4.2. Actividad quitinasa

Tal y como ocurre en el caso de la actividad peroxidasa, no se detectaron diferencias significativas en la actividad quitinasa en ninguno de los tratamientos realizados, a pesar de que se observó un ligero incremento de la actividad en las plantas inducidas con BAP e inoculadas con el patógeno (Fig. 4.2). De hecho, el análisis estadístico con ANOVA indicó que no había diferencias significativas ya que los p-valores eran superiores a 0,05 (p-valor para control/BAP= 0,6713, p-valor para inoculado/no inoculado= 0,2229, p-valor para la interacción los tratamientos= 0,8935). Por lo tanto, los resultados muestran que la presencia de BAP o *Phytophthora capsici* en las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. no inducen la expresión de la actividad glucanasa en estas condiciones experimentales.

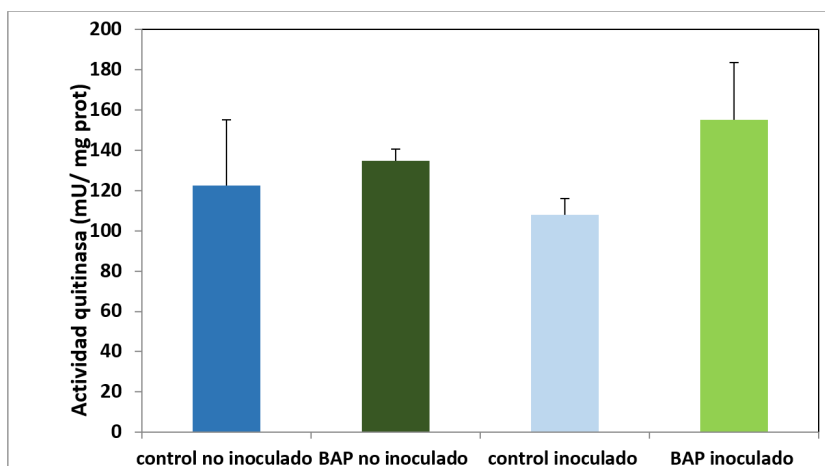


Fig. 4.2. Medidas de la actividad quitinasa en las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. control e inducidas con BAP, en presencia o ausencia de *Phytophthora capsici*. Los datos son la media más el error estándar de tres experimentos independientes (n=3).

4.3. Actividad glucanasa

Los resultados derivados de los análisis de la actividad glucanasa indicaron que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (control y BAP) e inoculados/no inoculados, así como tampoco interacciones entre ellos con un 95,0% de nivel de confianza (Fig. 4.3) a pesar de que se observa un ligero incremento en el tratamiento control e inoculado con el patógeno y en las plantas inducidas con BAP inoculadas con el patógeno. De hecho, al aplicar el test estadístico ANOVA se obtuvieron datos de p-valor superiores a $\alpha= 0,05$ (p-valor para control/BAP= 0,2743, p-valor para inoculado/no inoculado= 0,8223, p-valor para la interacción entre ellos= 0,6303). Estos valores indicaron que la actividad glucanasa en las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. no es incrementada ni por BAP ni por *Phytophthora capsici*.

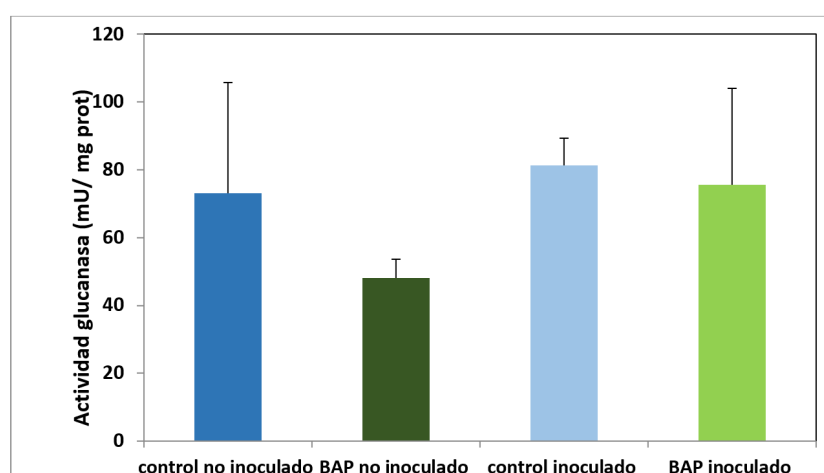


Fig. 4.3.1. Medidas de la actividad glucanasa en las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. control e inducidas con BAP, en presencia o ausencia de *Phytophthora capsici*. Los datos son la media más el error estándar de tres experimentos independientes (n=3).

5. Discusión

Las citoquininas intervienen en muchos procesos fisiológicos de las plantas y también en la comunicación entre plantas y fitopatógenos (Cortleven *et al.*, 2018). Es por ello que la producción de las citoquininas en muchas ocasiones se debe precisamente al ataque de determinados fitopatógenos (Höning *et al.*, 2018). En la mayor parte de los casos las estrategias de las plantas para defenderse de organismos biotróficos y hemibiotróficos dependen del ácido salicílico, y en el caso de necrótrofos del jasmonato y el etileno. Esta defensa la llevan a cabo mediante la SAR y la ISR, a las cuales están vinculadas las citoquininas (Cortleven *et al.*, 2018). En este trabajo de investigación el patógeno empleado fue *Phytophthora capsici*, un organismo hemibiotrófico.

En estudios previos demostraron que la aplicación de citoquininas aumentó la resistencia de varias plantas a patógenos hemibiotróficos. De hecho, la aplicación exógena de citoquininas a plantas de *Arabidopsis* provocó un incremento en la resistencia frente al patógeno *Verticillium longisporum*. Similarmente, la aplicación conjunta de citoquininas y ácido salicílico también aumentó la resistencia de *Arabidopsis* al hongo patógeno *Hyaloperonospora arabidopsis* (Cortleven *et al.*, 2018). En otro trabajo de investigación, realizado con un patógeno necrotrofico, Rey-Casal (2016) concluyó que el tratamiento con BAP no produjo cambios en la actividad peroxidasa, $\beta(1,3)$ -glucanasa y quitinasa en *Zinnia elegans* frente a *Botrytis cinerea*. Sin embargo, Cotel-Morales (2016) observó un aumento de la actividad peroxidasa al aplicar BAP a *Phaseolus vulgaris* L. e inocular estas plantas con *Botrytis cinerea*. Este resultado sugiere que BAP podría incrementar la resistencia de *Phaseolus vulgaris* L. a *Botrytis cinerea*.

Por otro lado, Pardiño-Orol (2016) mostró que la aplicación exógena de BAP a la superficie de las hojas de *Phaseolus vulgaris* L. confiere protección a nivel sistémico y local contra la infección por *Phytophthora capsici*, observándose una mayor disminución de los síntomas a nivel local, lo que puede venir dado por un posible efecto fungicida que no ocurre a nivel sistémico. Además, la aplicación de BAP en la superficie de las hojas de *Phaseolus vulgaris* L., también disminuyó los niveles de compuestos fenólicos con respecto a las plantas control. Sin embargo, como muestran los resultados obtenidos en este trabajo de investigación la aplicación exógena de BAP no incrementó la actividad peroxidasa, glucanasa y quitinasa en *Phaseolus vulgaris* L. por lo que no estarían implicadas en la resistencia de esta planta frente a *Phytophthora capsici*. Este hecho podría deberse a varios factores, como por ejemplo que la resistencia se deba a otro tipo de proteínas relacionadas con la patogénesis, a una concentración insuficiente de BAP o incluso a que el patógeno haya sido capaz de disminuir los niveles de citoquininas. De hecho, en *Arabidopsis* la infección con *Verticillium longisporum* provocó un descenso de los niveles de *trans*-zeatina, pero

un aumento en la concentración de las citoquininas aplicadas mejoró la resistencia contra este patógeno (Cortleven *et al.*, 2018).

6. Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la aplicación exógena de BAP sobre las hojas de *Phaseolus vulgaris* L. no aumenta la actividad peroxidasa, quitinasa ni glucanasa; por lo que estas enzimas no estarían implicadas en la resistencia de *Phaseolus vulgaris* L. frente a *Phytophthora capsici*.

Os resultados obtidos neste traballo indican que a aplicación esóxena de BAP sobre as follas de *Phaseolus vulgaris* L. non aumenta a actividade peroxidasa, quitinasa nin glucanasa; polo que estas enzimas non estarían implicadas na resistencia de *Phaseolus vulgaris* L. fronte a *Phytophthora capsici*.

The results obtained in this work indicate that the exogenous application of BAP on the leaves of *Phaseolus vulgaris* L. does not increase the peroxidase, chitinase or glucanase activities, and therefore, these enzymes would not be involved in the resistance of *Phaseolus vulgaris* L. against *Phytophthora capsici*.

7. Bibliografía

Abeysekara, N.S., Hickman, H., Westhader, S., Johnson, G.C., Evans, T.A., Gregory, N.F. y Donofrio, N.M. (2019). Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from lima bean grown in Delaware, United States of America. *Phytopathologia Mediterranea*, 58: 535-546.

AgriSolver. La marchitez del chile: manejo integrado de *Phytophthora capsici* <https://www.agrisolver.com/blog/la-marchitez-del-chile-manejo-integrado-de-phytophthora-capsici> Última consulta: 02/02/2020.

Ashajyothi, M., Kumar, A., Sheoran, N., Ganesan, P., Gogoi, R., Subbaiyan, G.K. y Bhattacharya. (2020). Black pepper (*Piper nigrum* L.) associated endophytic *Pseudomonas putida* BP25 alters root phenotype and induces defense in rice (*Oryza sativa* L.) against blast disease incited by *Magnaporthe oryzae*. *Biological control*, 143: 104181.

- Balasubramanian, V., Vashish, D., Cletus, J. y Sakthivel, N.** (2012). Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*, 34, 1983-1990.
- Barchenger, D.W., Lamour, K.H. y Bosland, P.W.** (2018). Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 628.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. y Jones, R.L.** (2015). Biochemistry & molecular biology of plants. Second Edition. Chichester, West Sussex, UK, page: 785-795, 850-852.
- Camarena-Gutiérrez, G. y de la Torre-Almaráz, R.** (2007). Resistencia adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13: 157-162.
- Chen, L., Zhao, J., Song, J. y Jameson, P.E.** (2019). Cytokinin dehydrogenase: a genetic target for yield improvement in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 18: 614-630.
- Cheng, W., Lin, M., Qiu, M., Kong, L., Xu, Y., Li, Y., Wang, Y., Ye, W., Dong, S., He, S. y Wang Y.** (2019). Chitin synthase is involved in vegetative growth, asexual reproduction and pathogenesis of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora sojae*. *Environmental Microbiology*, 21: 4537-4547.
- Cooke, D. E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. y Brasier, C.M.** (2000). A molecular phylogeny of phytophthora and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30: 17-32.
- Cornell University.** Phytophthora blight (*P. capsici*) <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html> Última consulta: 02/02/2020.
- Cortleven, A., Leuendorf, J.E., Frank, M., Pezzetta, D., Bolt, S. y Schmölling, T.** (2018). Cytokinin action in response to abiotic and biotic stress in plants. *Plant, Cell and Environment*, 42: 998-1018.
- Cotelo Morales, M.** (2016). Propiedades de la bencilaminopurina para el control de *Botrytis cinerea* en judía: actividad fungicida e inducción de resistencia. Trabajo fin de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad da Coruña.
- Díaz, J., Silvar, C., Varela, M.M., Bernal, A. y Merino, F.** (2005). *Fusarium* confers protection against several mycelia pathogens of pepper plants. *Plant Pathology*, 54: 773-780.

Díaz-González, T.E., Fernández-Carvajal Álvarez, M.C. y Fernández Prieto, J.A. (2004). Curso de Botánica. EDICIONES TREA, S.L., Gijón (Asturias).

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2019). <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> Última consulta: 11/02/2020.

Feng, B., Li, P., Wang, H, y Zhang, X. (2010). Functional analysis of Pcpme6 from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbial Pathogenesis*, 49: 23-31.

Feys, B.J. y Parker, J.E. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. Genes in plant resistance. *Elsevier Science Ltd*, 16: 449-455.

García-Jiménez, J., Monte, E. y Trapero, A. (2010). Los hongos y oomicetos fitopatógenos. En: Jiménez Díaz, R.M., Seguí, E.M. Editores. Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. SEF-Phytoma, Valencia, España, págs.: 23-50.

GroBkinsky, D.K., Naseem, M., Abdekmhsen, U.R., Plickert, N., Engelke, T., Griebel, T., Zeier, J., Novák, O., Strnad, M., Pfeifhofer, H., van der Graaff, E., Simon, U. y Roitsch, T. (2011). Cytokinins mediate resistance against *pseudomonas syringae* in tobacco through increase antimicrobial phytoalexin synthesis indepent of salicylic acid signaling. *Plant Physiology*, 157 815-830.

Haney, C.H., Wiesmann, C.L., Shapiro, L.R., Melnyk, R.A., O'Sullivan, L.R., Khorasani, S., Xiao, L., Han, J., Bush, J., Carrillo, J., Pierce, N.E. y Ausubel, F.M. (2017). Rhizosphere-associated *Pseudomonas* induce systemic resistance to herbivores at the cost of susceptibility to bacterial pathogens. *Molecular Ecology*, 1833-1847.

Hausbeck, M.K. y Lamour, K.H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease*, 88: 1292-1303.

Heil, M. y Bostock, R.M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*, 89: 503-512.

Höning, M., Plíhalová, L., Husičkova, A., Nisler, J. y Doležal. (2018). Role of cytokinins in senescence, antioxidant defence and photosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 4045.

Jiménez Díaz, R.M. y Zabalgoceazcoa, I. (2010). Infección y patogénesis en las micosis vegetales. En: Jiménez Díaz, R.M., Seguí, E.M. Editores. Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. SEF-Phytoma, Valencia, España, págs.: 51-85.

- Joshi, R., Sahoo, K.K., Tripathi, A.K., Kumar, R., Gupta, B.K., Pareek, A. y Singla-Preek, S.L.** (2017). Knockdown of fan inflorescence meristem-specific cytokinin oxidase – OsCKX2 in rice reduces yield penalty under salinity stress condition. *Plant, Cell and Environment*, 41: 936-946.
- Kieber, J.J. y Schaller, G.E.** (2002). Cytokinins. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists. 1-35.
- Kieber, J.J. y Schaller, G.E.** (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development at a glance, The Company of Biologists*, 1-7.
- Lamour, K.H., Stam R., Jupe, J. y Huitema, E.** (2012) The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13: 329-337.
- Li, P., Feng, B., Wang, H., Tooley, P.W. and Zhang X.** (2011). Isolation of nine *Phytophthora capsici* pectin methylesterase genes which are differentially expressed in various plant species. *Journal of Basic Microbiology*, 51:61-70.
- Li, Y., Yu, T., Wu, T., Wang, R., Wang, H., Du, H., Xu, X., Xie, D. y Xu, XM.** (2019). The dynamic transcriptome of pepper (*Capsicum annuum*) whole roots reveals an important role for the phenylpropanoid biosynthesis pathway in root resistance to *Phytophthora capsici*. *Gene*, 728: 1-10.
- Naseem, M., Kaldorf, M. y Dandekar, T.** (2015). The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *Journal of Experimental Botany*, 66: 4885-4896.
- Nuez, F., Carrillo, J.M. y Pérez de la Vega, M.** (2004). La resistencia genética a patógenos vegetales y la mejora vegetal. En: Nuez, F., Pérez de la Vega, M. and Carrillo, J.M. Editores. Resistencia genética a patógenos vegetales. Universidad Politécnica de Valencia y Universidad de León, España, págs.: 5-38.
- Ocampo, C.H., Martín, J.P., Sánchez-Yélamo, M.D., Ortiz, J.M., y Toro, O.** (2005). Tracing the origin of Spanish common bean cultivars using biochemical and molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 33-40.
- Pardiño-Orol, C.** (2016). Regulación da resistencia a *Phytophthora capsici* por citocininas en feixón. Trabajo fin de Grao. Facultade de Ciencias. Universidade da Coruña.

Piccini, C., Parrotta, L., Faleri, C., Romi, M., Del Duca, S. y Cai, G. (2018). Histomolecular responses in susceptible and resistant phenotypes of *Capsicum annum* L. *Phytophthora capsici*. *Scientia Horticulturae*, 244: 122-133.

Reis, A., Paz-Lima, M.L., Williams Moita, A., Mendes Aguilar, Frederick., de Noronha Fonseca, M.E., Corrêa Café-Filho, Adalberto. y Silva Boiteux, L. (2018). A reappraisal of the natural and experimental host range of neotropical *Phytophthora capsici* isolates from solanaceae, cucurbitaceae, rosaceae, and fabaceae. *Journal of Plant Pathology*, 100: 215-223.

Rey-Casal, C. (2016). Ensayo del etileno y de una citoquinina como posibles fitosanitarios frente a *Botrytis cinerea* en la planta ornamental *Zinnia elegans*. Trabajo fin de Máster. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña.

Roberts, P.D. and Kucharek, T.A. (2018). Vegetable diseases caused by *Phytophthora capsici* in Florida. *Plant Pathology Department, UF/IFAS Extension, University of Florida*.

Romera, F.J., García, M.J., Lucena, C., Martínez-Medina, A., Aparicio, M.A., Ramos, J., Alcántara, E., Angulo, M. y Pérez-Vicente, R. (2019). Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Frontiers in Plant Science*, 10: 287.

Sharma, C.K., Vishnoi, V.K., Dubey, R.C. y Maheshwari, D.K. (2017). A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mung bean. *Rhizosphere*, 5: 71-75.

Shine, M.B., Xiao, X., Kachroo, P. y Kachroo, A. (2017). Signal mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science*, 279: 81-86.

Silvar, C., Merino, F. y Díaz, J. (2006). Diversity of *Phytophthora capsici* in northwest Spain: analysis of virulence, metalaxyl response, and molecular characterization. *Plant Disease*, 90: 1135-1142.

Sørensen, J.L., Benfield, A.H., Wollenberg, R.D., Westphal, K., Wimmer, R., Nielsen, M.R., Nielsen, K.F., Carere, J., Covarlli, L., Beccari, G. Powell, J., Yamashino, T., Kogler, H., Sondergaard, T.E. y Gardiner, D.M. (2017). The cereal pathogen *Fusarium pseudograminearum* produces a new class of active cytokinins during infection. *Molecular Plant Pathology*, 19: 1140-1154.

Spallek, T., Gan, P., Kadota, Y. y Shirasu, K. (2018). Same tune, different song – cytokinins as virulence factors in plant-pathogen interactions? *Current Opinion in Plant Biology*, 44:8 2-87.

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M. y Murphya, A. (2015). Plant physiology and development (Sixth Edition). *Sinauer Associates Inc* publishres, Sunderland, Massachusetts, U.S.A, pags.:421-433, 682-684.

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M. y Murphya, A. (2018). Signals and signal transduction. En: Fundamentals of plant physiology. *Sinauer Associates*, Oxford University Press, New York, U.S.A, page: 355.

Tyler, B. M. (2002). Molecular basis of recognition between phytophthora pathogens and their hosts. *Annual Review Phytopathology*, 40: 137-167.

Vallad, G.E. y Goodman, R.M. (2004). Systemic acquired resistance and induced resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 44: 1920-1934.

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

Walters, D.R., Ratsep, J. y Havis, N.D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64: 1263-1280.

Wang, C., Wang, G., Gao, Y., Lu, G., Habben, J.E., Mao, G., Chen, G., Wang, J., Yang, F., Zhao, X., Zhang, J., Mo, H., Qu, P., Liu, J. y Greene, T.W. (2020). A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditios in rice. *Plant Molecular Biology*, 102: 373-388.

Wang, X., Bi, W., Gao, J., Yu, X., Wang, H. y Liu, D. (2018). Systemic acquired resistance, *NPRI*, and pathogenesis-related genes in wheat and barley. *Journal of Integrative Agriculture*, 17: 2468-2477.

Wei, H., Movahedi, A., Xu, C., Sun, W., Wang, X., Li, D. and Zhuge, Q. (2019). Overexpresion of *PtDefensin* enhances resistance to *Septotris populiperda* in transgenic poplar. *Plant Science*, 292: 1-9.

Wikipedia. Bencilaminopurina <https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Benzyaminopurine.svg>
Última consulta: 08/02/2020.