



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



## Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

**Relevancia del etileno en la inducción de resistencia por PO212 frente a *Phytophthora capsici* en pimiento.**

**Relevancia do etileno na indución de resistencia por PO212 fronte a *Phytophthora capsici* en pemento.**

**Relevance of ethylene in the induction of resistance by PO212 against *Phytophthora capsici* in pepper.**

---

Pedro Sánchez García

Curso 2020-2021 | Julio 2021

Directores académicos: José Díaz Varela y Javier Veloso Freire

---



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



## TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN BIOLOGIA MOLECULAR, CELULAR Y GENETICA

D. JOSÉ DÍAZ VARELA, CATEDRÁTICO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, Y D. JAVIER VELOSO FREIRE, CONTRATADO POSTDOCTORAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que el presente Trabajo de Fin de Máster presentado por el alumno PEDRO SÁNCHEZ GARCÍA y titulado:

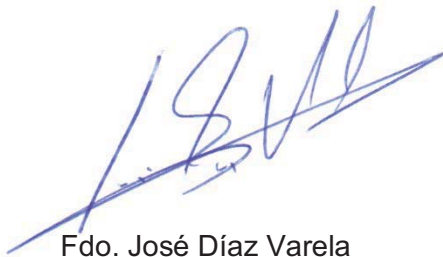
“Relevancia del etileno en la inducción de resistencia por PO212 frente a *Phytophthora capsici* en pimiento”

“Relevancia do etileno na indución de resistencia por PO212 fronte a *Phytophthora capsici* en pemento”

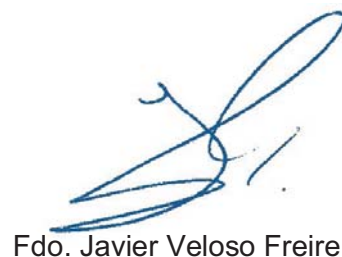
“Relevance of ethylene in the induction of resistance by PO212 against *Phytophthora capsici* in pepper”

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

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en A Coruña, a 15 de Julio de 2021.



Fdo. José Díaz Varela



Fdo. Javier Veloso Freire



Conforme: Fdo. Pedro Sánchez García

# ÍNDICE

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>3</b>  |
| 1. El pimiento ( <i>Capsicum</i> spp.) .....  | 3         |
| 2. <i>Phytophthora capsici</i> .....  | 5         |
| 3. Estrategias de defensa de las plantas .....  | 8         |
| 4. Resistencia sistémica.....   | 11        |
| 5. Inducción de resistencia mediante agentes de biocontrol .....  | 12        |
| 6. <i>Penicillium rubens</i> cepa PO212.....  | 13        |
| <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....   | <b>16</b> |
| 1. Material vegetal .....   | 16        |
| 2. Material fúngico.....  | 16        |
| 3. Tratamiento de las plantas con 1-metilciclopropeno (MCP).....  | 16        |
| 4. Tratamiento de las plantas con PO212 .....   | 16        |
| 5. Inoculación de las plantas con <i>Phytophthora capsici</i> .....   | 17        |
| 6. Medida de los síntomas ocasionados por <i>Phytophthora capsici</i> .....   | 17        |
| 7. Preparación de muestras para medida de fenoles solubles totales y ensayos de expresión génica ..   | 18        |
| 8. Determinación de fenoles solubles totales.....   | 18        |
| 9. Ensayos de expresión génica .....  | 19        |
| 10. Análisis estadísticos .....   | 21        |
| <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>22</b> |
| 1. Ensayo del efecto de la aplicación de MCP en la inducción de resistencia frente a <i>Phytophthora capsici</i> en plantas de pimiento ..... | 22        |
| 2. Análisis de expresión de <i>CaPO1</i> .....  | 23        |
| 3. Análisis de expresión de <i>CaBPR1</i> .....   | 24        |
| 4. Análisis de expresión de <i>CaACO</i> .....  | 25        |
| 5. Análisis de expresión de <i>CaSCI</i> .....  | 26        |
| 6. Análisis de fenoles solubles totales .....   | 27        |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....  | <b>28</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | <b>34</b> |

## RESUMEN

---

El cultivo de pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* cv. Padrón) presenta una gran relevancia económica en Galicia. Al igual que sucede con el resto de las plantas, se encuentra expuesto al ataque de un amplio rango de patógenos, siendo el oomiceto *Phytophthora capsici* el más devastador. Como consecuencia de la contaminación por los fungicidas empleados para su tratamiento y la aparición de resistencias, en los últimos años se ha incrementado el empleo de agentes de biocontrol como una alternativa a los agroquímicos que proporciona una protección eficaz basada en la resistencia natural de la planta. Actualmente, para optimizar el uso de los agentes de biocontrol, es preciso llevar a cabo investigaciones para conocer la relevancia de los diferentes factores implicados en este tipo de resistencia.

En este trabajo se ha estudiado el papel del etileno en el mecanismo de inducción de resistencia por la cepa 212 de *Penicillium rubens* (PO212) en plantas de pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* cv. Padrón) frente a *Phytophthora capsici*. Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de la percepción del etileno aplicando 1-metilciclopropeno (MCP) a la planta, provoca una reducción de la resistencia inducida por el agente de biocontrol PO212. Varios factores fisiológicos fueron medidos (expresión de *CaPO1*, *CaBPR1*, *CaACO* y *CaSCI* y cantidad de fenoles solubles totales) para determinar la importancia del MCP en la regulación de la respuesta inducida por el agente de biocontrol PO212, observándose que el MCP redujo la expresión del gen de biosíntesis de la principal fitoalexina de pimiento, el capsidiol.

## RESUMO

---

O cultivo de pemento de Padrón (*Capsicum annuum* cv. Padrón) presenta unha gran relevancia económica en Galicia. Do mesmo xeito que sucede co resto das plantas, atópase exposto ao ataque dun amplo rango de patóxenos, sendo o oomiceto *Phytophthora capsici* o máis devastador. Como consecuencia da contaminación polos fungicidas empregados para o seu tratamento e a aparición de resistencias, nos últimos anos incrementouse o emprego de axentes de biocontrol como unha alternativa aos agroquímicos que proporciona unha protección eficaz baseada na resistencia natural da planta. Actualmente, para optimizar o uso dos axentes de biocontrol, é preciso levar a cabo investigación para coñecer a relevancia dos diferentes factores implicados neste tipo de resistencia.

Neste traballo estudouse o papel do etileno no mecanismo de indución de resistencia pola cepa 212 de *Penicillium rubens* (PO212) en plantas de pemento de Padrón (*Capsicum annuum*

cv Padrón) fronte a *Phytophthora capsici*. Os resultados obtidos suxiren que a inhibición da percepción do etileno aplicando 1-metilciclopropeno (MCP) á planta, provoca una redución da resistencia inducida polo axente de biocontrol PO212. Varios factores fisiolóxicos foron medidos (expresión de *CaPO1*, *CaBPRI*, *CaACO* y *CaSCI* e cantidade de fenois solubles totais) para determinar a importancia do MCP na regulación da resposta inducida polo axente de biocontrol PO212, observándose que o MCP reduciu a expresión do xen de biosíntesis da principal fitoalexina de pemento, o capsidiol.

## ABSTRACT

---

The cultivation of Padrón pepper (*Capsicum annuum* cv. Padrón) has great economic relevance in Galicia. As with the rest of the plants, it is exposed to the attack of a wide range of pathogens, being the oomycete *Phytophthora capsica* the most devastating. As a consequence of contamination by the fungicides used for their treatment and the appearance of resistance, in recent years the use of biocontrol agents has increased as an alternative to agrochemicals that provides effective protection based on the natural resistance of the plant. Currently, to optimize the use of biocontrol agents, it is necessary to carry out research to find out the relevance of the different factors involved in this type of resistance.

In this work, the role of ethylene in the resistance induction mechanism by *Penicillium rubens* strain 212 (PO212) in Padrón pepper plants (*Capsicum annuum* cv. Padrón) against *Phytophthora capsici* has been studied. The results obtained suggest that the inhibition of the perception of ethylene applying 1-methylcyclopropene (MCP) to the plant causes a reduction in the resistance induced by the biocontrol agent PO212. Several physiological factors were measured (expression of *CaPO1*, *CaBPRI*, *CaACO* and *CaSCI* and amount of total soluble phenols) to determine the importance of MCP in regulating the response induced by the biocontrol agent PO212, observing that MCP reduced the expression of the biosynthesis gene of the main phytoalexin of pepper, capsidiol.

# INTRODUCCIÓN

## 1. El pimiento (*Capsicum* spp.)

El género *Capsicum*, pertenece a la familia Solanaceae y tiene su origen en la región tropical de América del Sur, conocida actualmente como Bolivia. Este género comprende 27 especies (**Figura 1**), 5 de las cuales se domesticaron a través de distintos eventos de diversificación y son cultivadas a nivel mundial debido a su versatilidad en fines alimenticios y médicos: *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L. y *C. pubescens* Ruiz-Pavón (González-Pérez *et al.*, 2014). Desde su domesticación en los tiempos precolombinos, el pimiento se ha distribuido por todo el mundo. Se introdujo en Europa a finales del siglo XV y posteriormente se dispersó en distintos países del Mediterráneo, África, India y China.



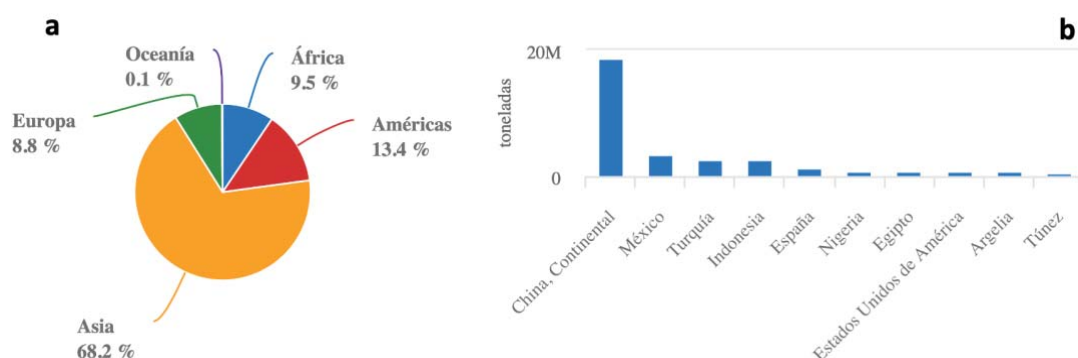
**Figura 1.** Género *Capsicum* clasificado por forma, tamaño y color del fruto (1). Diferentes tipos de flor en *C. annuum* (2), *C. baccatum* (3), *C. chinense* (4), *C. frutescens* (5) y *C. pubescens* (6) (Hernández-Pérez *et al.*, 2020).

*C. annuum* L. es la especie que tuvo el mayor éxito en los lugares donde se introdujo, la más cultivada en la actualidad y, por tanto, de mayor importancia económica (González-Pérez *et al.*, 2014). Esta especie presenta unas flores de color blanco y solitarias por nudo, mientras que los frutos son de diferentes formas, tamaño, color, aroma y sabor dependiendo de su estado de maduración (Perry *et al.*, 2007; Hernández-Pérez *et al.*, 2020). La producción del pimiento a nivel mundial se ha incrementado en los últimos años, constituyendo la octava hortaliza más producida con un valor superior a 37 millones de toneladas (Tn) (**Tabla 1**) (FAO, 2020).

**Tabla 1.** Producción mundial de hortalizas (Tn) en 2019 (FAO, 2020)

| Hortalizas           | Producción (Tn) |
|----------------------|-----------------|
| Tomates              | 180.766.329     |
| Cebollas             | 99.968.016      |
| Pepinos y pepinillos | 87.805.086      |
| Coles                | 70.150.406      |
| Berenjenas           | 55.197.878      |
| Zanahoria            | 44.762.859      |
| Pimientos            | 38.027.164      |
| Ajo                  | 30.708.243      |
| Espinacas            | 30.107.231      |
| Lechuga              | 29.134.653      |

Asia es el continente que presenta una mayor producción de pimiento, con más de la mitad del total en el mundo. En segundo lugar, se encuentra América, seguido de África y Europa, con unos valores de producción próximos entre sí (**Figura 2a**) (FAO, 2020).



**Figura 2.** (a) Diagrama de la proporción de la producción de pimiento en los distintos continentes en 2019 (FAO, 2020). (b) Principales países con mayor producción de pimiento (Tn) en 2019 (FAO, 2020).

Atendiendo a los 10 países con mayor producción de pimiento en 2019 (**Figura 2b**), podemos observar que España, con 1.402.380 Tn, es la quinta potencia mundial. A nivel nacional, las comunidades con una mayor producción y superficie cultivada de pimiento son Andalucía, Murcia y Galicia, siendo el cultivo hortícola de mayor producción después del tomate y la cebolla (MAPA, 2019).

## 1.1 Pimiento de Padrón

El pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón) es un ecotipo local cultivado en la localidad de Padrón, de la provincia de A Coruña (**Figura 3**). Se considera que fue introducido a través de unas semillas traídas por los monjes Franciscanos a su Casa de Misiones de Herbón, en el siglo XVII (Rivera Martínez *et al.*, 2003). El clima y la naturaleza de esta región son ideales para el cultivo de esta variedad, lo que permitió su aclimatación y extensión de manera rápida. El fruto es semicartilaginoso, colgante, de morfología variable, textura rugosa, color verde intenso en estado de inmadurez y rojo en estado maduro, que lo hacen muy demandado y apreciado por los consumidores (Rivera Martínez *et al.*, 2003; Chenlo *et al.*, 2006). Son comercializados en un estado inmaduro y se distinguen por un sabor característico como consecuencia de los niveles de capscicina, que están relacionados con factores ambientales como la temperatura, luz, suelo, selección de semillas y método de cultivo empleado (López-Hernández *et al.*, 1996; Estrada *et al.*, 1998).



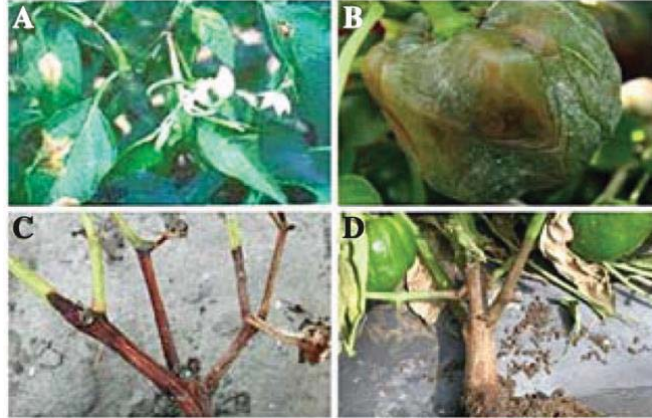
**Figura 3.** Fruto del pimiento de Padrón. <https://www.gettyimages.es/detail/foto/padron-peppers-imagen-libre-de-derechos/1032761998>.

## 2. *Phytophthora capsici*

Al igual que otras hortalizas, el pimiento es susceptible al ataque de diversos patógenos, lo que resulta en pérdidas de producción. Pomar *et al.* (2001) demostraron que *Phytophthora capsici* es, junto con el hongo *Verticillium dahliae*, el patógeno más prevalente y destructivo en el ataque de plantas de pimiento en Galicia. Se trata de un oomiceto con una distribución geográfica mundial, cuya infección puede tener lugar en cualquier etapa de crecimiento del pimiento y afectar a raíces, hojas y fruto de la planta (Silvar *et al.*, 2005). Los síntomas más comunes son la formación de depresiones en el cuello de la planta, marchitez de hojas y una fase de pudrición caracterizada por la coloración marrón oscura del tallo, que se extiende

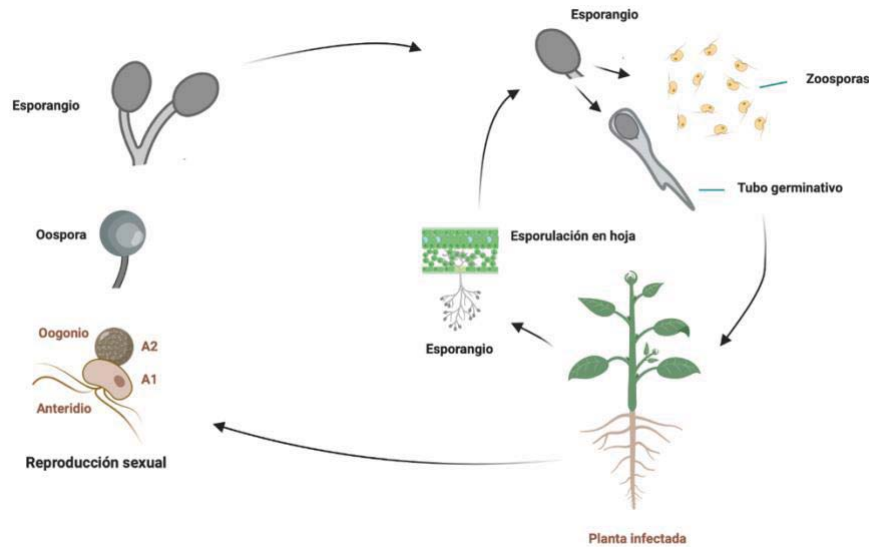


progresivamente conforme avanza el oomiceto (**Figura 4**) (Majid *et al.*, 2016). Esta fase de pudrición está acompañada de un marchitamiento, deshidratación y muerte de tejidos, así como de la obstrucción del sistema vascular, que conduce a la muerte de la planta en la etapa final de infección (Gayoso *et al.*, 2003).



**Figura 4.** Lesiones ocasionadas por el ataque de *Phytophthora capsici*. (A) marchitez y heridas en hojas. (B) Marchitez del fruto. (C) Necrosis en tallo. (D) Engrosamiento en tallo (Majid *et al.*, 2016)

En lo que respecta a su ciclo biológico, *Phytophthora capsici* es una especie heterotálica, con dos tipos de apareamiento, A1 y A2, que interactúan y se aparean, para producir esporas sexuales (oosporas). Estas son resistentes a disecación, bajas temperaturas y otras condiciones ambientales extremas, de manera que pueden sobrevivir en el suelo durante años en ausencia de una planta hospedadora, en este caso pimiento, aunque *Phytophthora capsici* también afecta a las familias Cucurbitaceae y Fabaceae. Cuando germinan, producen esporangios y zoosporas. Estas últimas se liberan en el agua y se dispersan por riego o en gotas de lluvia, siendo capaces de moverse en el agua del suelo durante varias horas hasta que alcanzan los tejidos de una planta. Posteriormente, se adhieren, comienza la formación del micelio en los tejidos y avanza gracias a la capacidad de secreción de enzimas que degradan pectinas (**Figura 5**) (Koç *et al.*, 2011).



**Figura 5.** Ciclo biológico de *Phytophthora capsici*. (elaboración propia)

*Phytophthora capsici* se clasifica como un patógeno hemibiotrofo, es decir, el proceso de infección posee dos fases diferentes: cuando comienza la infección, las células no se ven afectadas, lo que indica que utiliza los nutrientes y agua aportados por estas. En cambio, cuando el patógeno coloniza los tejidos y avanza la infección, se produce la muerte de las células infectadas, necrosis y el colapso del sistema vascular (Piccini *et al.*, 2019). Todo ello, junto con la producción de esporangios en la superficie de los tejidos, conduce a la muerte de la planta (Thaboub *et al.*, 2008).

Cabe destacar que el óptimo de crecimiento de *Phytophthora capsici* se produce con una temperatura comprendida entre 25 y 30 °C y un porcentaje de humedad relativa entre 60 y 80%. Este tipo de ambiente húmedo, con lluvias intensas, riego excesivo o un suelo mal drenado incrementa la incidencia y desarrollo de la enfermedad por *Phytophthora capsici*. En consecuencia, los sucesivos cultivos de cada temporada otorgan unas condiciones favorables para la formación de propágulos del patógeno en el suelo, dando como resultado un problema habitual para los agricultores todos los años.

A pesar de que existen tratamientos químicos, en concreto oomicidas derivados de fenilamida, este control a menudo es ineficaz por los múltiples daños ocasionados por este patógeno y la aparición de genotipos resistentes a esos oomicidas (Silvar *et al.*, 2006). *Phytophthora capsici* posee capacidad de mutar y desarrollar adaptaciones en la virulencia frente a un amplio rango de hospedadores. Por otra parte, la reproducción sexual implica que este patógeno mantiene una elevada diversidad genotípica, de tal forma que reúne todas las condiciones necesarias para mantener el éxito en infectar la planta (Mo *et al.*, 2014).

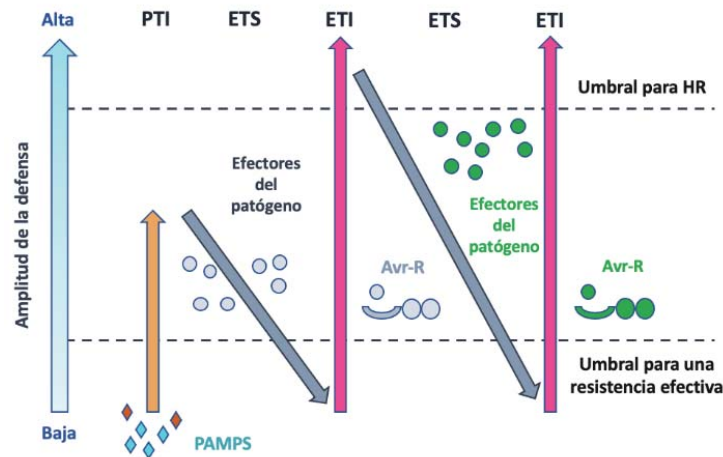
### 3. Estrategias de defensa de las plantas

---

Las plantas, como organismos sésiles, se encuentran expuestas de manera continua al estrés biótico ocasionado por el ataque de diversos patógenos como bacterias, hongos, oomicetos, virus y nematodos en el ambiente, que conducen a la pérdida en el rendimiento de los cultivos y, por tanto, a notables pérdidas económicas (David *et al.*, 2019). Para asegurar su supervivencia en estas condiciones hostiles, a pesar de que carecen de células inmunes especializadas, las plantas han desarrollado un sistema de defensas sofisticado y flexible que les permite modular un amplio rango de respuestas de manera optimizada en función de la etapa del desarrollo o la estación del año en la que se encuentren (Aerts *et al.*, 2021).

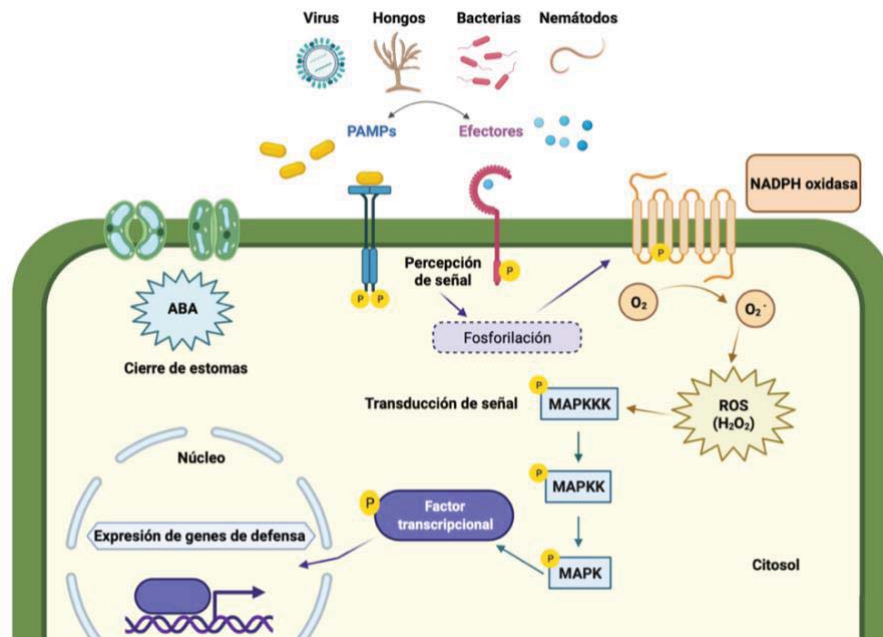
De esta forma, las plantas emplean una variedad de mecanismos de defensa para protegerse contra los patógenos, impidiendo su entrada e infección. Un primer tipo de mecanismo está representado por las defensas pasivas, que comprenden sistemas estructurales a modo de barreras físicas como son la presencia de la cutícula superficial, protuberancias, deposición de calosa, ceras y lignina en la pared celular y sistemas químicos, entre los que destacan la producción de fitoalexinas, que consisten en metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Bari & Jones, 2009; Hanley *et al.*, 2007; Luna *et al.*, 2011; Muthamilarasan & Prasad, 2013; Nürnberger *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2014).

En base a la coevolución planta-patógeno, la visión actual del sistema inmune en las plantas se representa con un modelo en zig-zag que describe las dos ramas de las estrategias moleculares para la defensa (**Figura 6**) (Bari & Jones, 2009; Jones & Dangl, 2006). Cuando un amplio rango de patógenos alcanzan una planta, estos son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) anclados en la superficie de las células, que se unen de manera específica a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales consisten fundamentalmente en moléculas conservadas en la mayoría de microbios patógenos o no, ausentes en las plantas huésped y con un papel estructural como el peptidoglicano en bacterias, glicoproteínas en oomicetos, quitina, glucanos, mananos y proteínas de la pared celular en hongos (Čerekovic & Poltronieri, 2017; Finkina & Ovchinnikova, 2018; Marcec *et al.*, 2019; Nishad *et al.*, 2020).



**Figura 6.** Esquema ilustrativo del modelo en zig-zag sobre las diferentes respuestas del sistema inmune de las plantas (modificado de Jones & Dangl, 2006)

La percepción de los PAMPs y posterior unión al correspondiente receptor de reconocimiento de patrones conduce a la activación de una respuesta inmune basal o innata denominada inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI), donde tienen lugar numerosos eventos de señalización, cascadas de fosforilación, cierre de estomas, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inducción de genes de defensa. No obstante, esta respuesta protege frente a aquellos patógenos que no están adaptados. En cambio, existen especies microbianas e insectos, que pueden ser patógenos, beneficiosos o neutros para la planta, resistentes y con la capacidad de secretar una variedad de moléculas llamadas efectores que suprimen la señalización de la PTI, impidiendo su funcionamiento y, por tanto, esquivan esta respuesta (**Figura 7**) (Dangl *et al.*, 2013; Luna *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014). Esto se conoce como susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS) y se debe principalmente a la represión de las rutas de señalización de hormonas efectivas en la defensa de la planta. En consecuencia, las plantas resistentes reconocen esos efectores de manera directa (lo menos habitual) o indirecta por su actividad, a través de unas proteínas denominadas proteínas R, dando como resultado la inmunidad desencadenada por efectores (ETI), que consiste en una segunda línea de defensa más fuerte, rápida y prolongada que la PTI. La ETI comprende reprogramación transcripcional, regulación de respuestas defensivas y un proceso de muerte celular programada en las regiones donde tiene lugar el foco de infección, conocido como respuesta hipersensible (HR) y que permite la contención del patógeno para evitar su acceso al agua y nutrientes y que se propague la infección al resto de la planta (Aerts *et al.*, 2021).



**Figura 7.** Modelo general de la inmunidad en plantas en respuesta a estrés biótico y abiótico. La percepción de los PAMPs y efectores de los patógenos desencadena la activación de la NADPH oxidasa, que produce especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de activar la cascada de MAPK. Esta ruta de transducción de señal finaliza con la activación de factores transcripcionales implicados en la regulación de inmunidad en plantas (elaboración propia).

En ambos tipos de respuesta, tanto para la PTI como la ETI, cabe destacar la compleja red de señalización existente para regular el sistema de defensas en la planta. En ella, intervienen numerosas hormonas con diferentes roles que desencadenan un amplio espectro de respuestas. Del conjunto de hormonas relacionadas con la inmunidad en plantas, el ácido salicílico y los jasmonatos son las dos mejor caracterizadas y necesarias para la activación de las defensas en respuesta a enfermedades y patógenos. La síntesis de salicílico es desencadenada por el ataque de patógenos biotrofos que obtienen nutrientes de las células, como bacterias, virus y ciertos hongos, mientras que los jasmonatos son esenciales para activar las defensas frente a patógenos necrotrofos que primero destruyen los tejidos de la planta y se alimentan de las células muertas resultantes, como el hongo *Botrytis cinerea*. No obstante, en los últimos años, se han ampliado conocimientos en torno a la importancia de otras hormonas en la señalización frente al estrés biótico como son el etileno, ácido abscísico, brasinosteroides, citoquininas, auxinas y giberelinas (Li *et al.*, 2020). De esta forma, resulta evidente que las plantas modulan los niveles de las hormonas para modificar la expresión de genes relacionados con defensas y coordinar las complejas interacciones entre las rutas de señalización para activar una respuesta defensiva efectiva contra el ataque de distintos patógenos (Bari & Jones, 2009).

#### 4. Resistencia sistémica

---

La defensa en las plantas no se limita a la defensa local producida en los tejidos que están siendo afectados, sino que estas han desarrollado una segunda línea de defensa conocida como resistencia sistémica que conduce a la activación de mecanismos de defensa en tejidos u órganos distales al sitio de infección. Este tipo de defensa recibe el nombre de resistencia sistémica adquirida (SAR), que puede ser desencadenada por exposición de la planta a organismos virulentos, avirulentos y no patógenos. La SAR está mediada por una molécula señal desconocida, de la que existen diferentes propuestas por varios autores, que se acumula en las células del tejido donde se produce la infección por el agente biótico y también en el resto de la planta (Buchanan *et al.*, 2000).

En consecuencia, tiene lugar la activación de la expresión de genes relacionados con defensa, como los que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) que comprenden quitinasas, glucanasas y otras proteínas relevantes en la protección frente a patógenos. También se induce la expresión de enzimas oxidativas como peroxidasas, polifenol oxidasas y lipoxigenasas implicadas en la lignificación de las paredes celulares y la síntesis de fitoalexinas (Choudhary *et al.*, 2007). Además, se produce una deposición de calosa en las paredes celulares con el fin de reforzar, junto con la lignificación, esta barrera física e impedir la entrada del patógeno, proporcionando una protección duradera (comprendida entre semanas y un mes) frente a un amplio espectro de patógenos, que incluyen virus, bacterias y hongos (Choudhary *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2016). Se puede afirmar que la SAR presenta similitud con la memoria inmunológica de la inmunidad adaptativa de mamíferos, pues le permite a la planta modular una respuesta en base a una experiencia pasada, aunque se distingue de esta en que no es específica y confiere una resistencia de amplio espectro (Finkina & Ovchinnikova, 2018).

No obstante, además de la SAR, existe otro tipo de resistencia sistémica, denominada resistencia sistémica inducida (ISR). En este caso, la ISR no es inducida por el ataque de agentes bióticos patógenos y no patógenos como sucede con la SAR, sino por rizobacterias simbióticas promotoras del crecimiento de las plantas, principalmente del género *Pseudomonas* y ciertas especies de hongos como las del género *Penicillium* (Panpatte *et al.*, 2020). La ISR es dependiente de la ruta de señalización de los jasmonatos y el etileno, que desencadenan la expresión de genes de defensa para proporcionar a la planta una protección efectiva frente a un espectro más restringido de patógenos, así como a herbívoros. Además, si la SAR es más efectiva frente a patógenos biotrofos, la ISR es más eficiente contra patógenos hemibiotrofos y necrotrofos (Choudhary *et al.*, 2007).

#### 4.1 Papel del etileno en la resistencia sistémica

El etileno, objeto de estudio en el presente trabajo, es una hormona gaseosa implicada en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas, tales como la germinación de las semillas, senescencia de varios órganos, maduración de frutos y abscisión de hojas, además de intervenir en respuestas frente a estrés abiótico. En lo que respecta al estrés biótico, este incrementa de manera considerable la producción de etileno, como una respuesta activa y temprana a la percepción del ataque del patógeno, que está asociada con la inducción de reacciones defensivas al promover la síntesis de fitoalexinas, proteínas PR y el refuerzo de las paredes celulares (Bari & Jones, 2009; van Loon *et al.*, 2006). Por tanto, el etileno ejerce un papel, aunque no imprescindible, para que se establezca la SAR en las plantas. En lo que respecta a la ISR, el etileno resulta fundamental, ya que esta es dependiente de una red de señalización en la que hay una actuación sinérgica con los jasmonatos (Dmitriev, 2003; van Loon *et al.*, 2006). Además, se ha observado que el tiempo de producción y cantidad de etileno resultante es crucial en la red de señalización de contacto entre la ISR y SAR, de tal forma que la planta es capaz de regular los mecanismos defensivos en función del tipo de patógenos que le atacan (Panpatte *et al.*, 2020).

#### 5. Inducción de resistencia mediante agentes de biocontrol

---

En este siglo, la humanidad se enfrenta al desafío de producir lo suficiente como para alimentar a la población de manera sostenible y respetuosa con el medio ambiente (Borges & Sandalio, 2015). Cada año los rendimientos de los cultivos se ven notablemente afectados por el estrés biótico ocasionado por el ataque de diversos patógenos. No obstante, cuando una planta es capaz de limitar la infección producida, adquiere una resistencia que suele ser parcial frente a posteriores ataques. Esta mejora en los mecanismos de defensa implica un menor número y dimensiones de las lesiones. En la actualidad, se persigue potenciar esta resistencia frente a un amplio rango de patógenos y lograr una protección eficiente de los cultivos, cumpliendo con el principal objetivo de los agricultores, que demandan estrategias con unos resultados similares a los obtenidos con pesticidas y fungicidas, así como una mayor seguridad para el medio ambiente (van Loon, 2008).

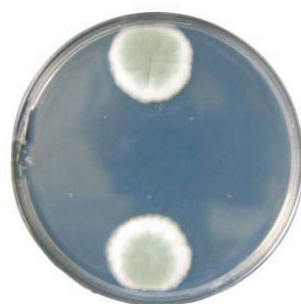
La aplicación masiva de productos químicos en los cultivos ha generado problemas como aparición de resistencias y daños en el ecosistema y la salud. En los últimos años se ha regulado su empleo por Directivas de la Unión Europea y se han dedicado numerosas investigaciones en el desarrollo de alternativas más seguras y respetuosas con el medio ambiente. Una de estas posibilidades es la inducción de resistencia por agentes de biocontrol, que consisten en

microorganismos beneficiosos, como hongos del género *Trichoderma* o *Penicillium* y bacterias del género *Pseudomonas*, capaces de reforzar las respuestas defensivas en las plantas (Durairaj *et al.*, 2017; Molinari & Leonetti, 2019).

Mediante esta aproximación, se ha demostrado con los resultados obtenidos en numerosos estudios realizados, que los agentes de biocontrol presentan una gran eficiencia y sostenibilidad para reducir la severidad e intensidad de las infecciones a largo plazo en cultivos con gran relevancia económica. Esto se debe fundamentalmente a que el agente de biocontrol genera una alteración en los mecanismos bioquímicos que regulan la inducción de resistencia, lo que le permite a la planta reaccionar de manera más rápida al posterior ataque del patógeno. Por tanto, cabe destacar que la aparición de resistencias por parte de los patógenos resulta menos probable debido a la complejidad de los mecanismos de acción de estos agentes. En lo que respecta a las limitaciones de esta estrategia, resulta fundamental ampliar el conocimiento de sus mecanismos, el papel de las hormonas implicadas en la inducción de resistencia y factores como genotipo y ambiente, para tomar decisiones sobre las dosis y frecuencia de administración del agente en función del cultivo. Otro aspecto importante es la formulación, ajuste e implementación de los extractos de estos agentes en el mercado bajo condiciones rentables para los agricultores (Rigueiro Messa, 2021).

## 6. *Penicillium rubens* cepa PO212

*Penicillium rubens* Currie et Thom es una de las especies con mayor distribución del género *Penicillium* (Espeso *et al.*, 2019). La cepa 212 de *P. rubens* (PO212) (**Figura 8**) es un hongo endófito, que se localiza en el suelo y que presenta una gran eficacia como agente de biocontrol frente a un amplio rango de enfermedades hortícolas producidas por patógenos fúngicos que provocan considerables pérdidas económicas.



**Figura 8.** Crecimiento de colonias de PO212 en una placa con medio PDA (Villarino *et al.*, 2016)



PO212 representa un agente de biocontrol prometedor cuyo modo de acción se basa en la inducción de resistencia, gracias al cual se puede prescindir del uso de productos químicos (De Cal *et al.*, 2008; Villarino *et al.*, 2016). Por ejemplo, se ha demostrado que la aplicación de conidios de PO212 en raíces es capaz de inducir resistencia en plantas de tomate frente a *Fusarium* y *Verticillium*, reduciendo entre un 20 y 80% la incidencia de la enfermedad y la marchitez, que conforma el síntoma principal de esta (Espeso *et al.*, 2019). Otras características importantes de esta cepa son su capacidad para crecer en condiciones diversas, resistir a concentraciones salinas elevadas y degradar xenobióticos como compuestos fenólicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Esto último permite su uso en procesos de biorremediación de bajo coste, ya que PO212, a diferencia de otras cepas de hongos requieren poca presencia de cosustratos en la actividad (Zehra *et al.*, 2018).

En trabajos previos se ha comprobado que PO212 es capaz de inducir resistencia frente a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para comprender el mecanismo de inducción de resistencia por agentes de biocontrol en cada tipo de cultivo y el papel de las hormonas implicadas, con el fin de determinar el mejor tratamiento. Por ello, resulta interesante investigar la influencia del etileno en la inducción de resistencia frente a *Phytophthora capsici* por PO212 en plantas de pimiento de Padrón.

## OBJETIVOS

---

- Evaluar la relevancia del etileno en la resistencia inducida por PO212 frente al patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón) aplicando 1-metilciclopropeno (MCP), un inhibidor competitivo en la percepción del etileno.
- Cuantificar el efecto fisiológico del tratamiento con MCP sobre la respuesta inducida por PO212 midiendo la expresión de los genes de defensa *CaPO1*, *CaBPR1*, *CaACO* y *CaSCI* y los niveles de fenoles solubles en las raíces de la planta.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## 1. Material vegetal

---

Como material vegetal de partida se emplearon plantas adultas de pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón) adquiridas en un vivero local A Agraria, Cambre). Se incubaron en el invernadero, regándose con una solución nutritiva de Hoagland.

## 2. Material fúngico

---

Se empleó la cepa PC450 del patógeno *Phytophthora capsici* como material fúngico para la realización de los ensayos. Se incubó en medio PDA (Patata Dextrosa Agar) a 23 °C para el mantenimiento y realización del posterior repicado del cultivo en medio V8 agar (agar, CaCO<sub>3</sub> y sopa comercial V8), incubándose, de nuevo, durante 4 días a 23 °C.

Para la realización de los ensayos de inducción de resistencia se utilizó la cepa 212 de *Penicillium rubens* (PO212) a partir de conidios liofilizados que se encontraban conservados en nevera (suministrados por la Dra. Inmaculada Larena, INIA, Madrid).

## 3. Tratamiento de las plantas con 1-metilciclopropeno (MCP)

---

Antes de los ensayos de inducción de resistencia con PO212 e inoculación con PC450, las plantas fueron sometidas a un tratamiento con 1-metilciclopropeno (MCP). Se expusieron dos grupos de dieciséis plantas al compuesto en cajas cerradas herméticamente. Dada la naturaleza gaseosa del MCP, se partió de una solución stock concentrada y se inyectó en una de las cajas, con una concentración final de 0,2 ppm a través de un septo empleando una jeringuilla (Díaz *et al.*, 2002). Las plantas se mantuvieron en las cajas durante 24 horas, con las raíces inmersas en solución nutritiva de Hoagland aireada durante la incubación con una bomba de acuario. La otra caja contenía las plantas control, en idénticas condiciones que la anterior excepto por la ausencia de MCP.

## 4. Tratamiento de las plantas con PO212

---

Se prepararon matraces Erlenmeyer con 100 mL de una suspensión de conidios de PO212 (Lois, 2019), que se mantuvieron en agitación a 150 rpm hasta realizar los correspondientes tratamientos. En lo que respecta a las plantas control, estas se trataron empleando el mismo volumen de solución nutritiva de Hoagland estéril. Se realizaron dos experimentos independientes.

En el tratamiento, llevado a cabo en los dos grupos de dieciséis plantas cada uno, se sumergieron las raíces de las plantas en 100 mL de la suspensión de conidios de PO212. Por otra parte, también se sumergieron las raíces de dos grupos de dieciséis plantas en solución

nutritiva de Hoagland estéril. A continuación, las plantas se mantuvieron en estas condiciones, durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se transfirieron las plantas a nuevos recipientes que contenían solución nutritiva de Hoagland estéril, manteniéndose a temperatura ambiente durante 24 horas (Lois, 2019).

Posteriormente, se ubicaron doce plantas en bandejas con pocillos que contenían un sustrato compuesto por tierra y vermiculita (proporción 3:1) hasta la inoculación con el patógeno.

Los cuatro tratamientos finales fueron los siguientes:

**(Co) Control:** 12 plantas no tratadas con PO212.

**(MCP) 1-metilciclopropeno:** 12 plantas expuestas a MCP sin tratamiento con PO212.

**(PO212) Cepa 212 de *P. rubens*:** 12 plantas tratadas con PO212.

**(MCP+PO212) Cepa 212 de *P. Rubens* + MCP:** 12 plantas expuestas a MCP y tratadas con PO212.

## **5. Inoculación de las plantas con *Phytophthora capsici***

---

Se llevó a cabo la inoculación con *Phytophthora capsici* mediante una suspensión de zoosporas. Con el fin de obtenerla, se cultivó el patógeno en medio V8 agar durante 4 días a 23 °C. Posteriormente, se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de los cultivos de V8 agar, se llevaron a un matraz Erlenmeyer con KNO<sub>3</sub> 0,01 M previamente esterilizado en autoclave y se incubaron en agitación a 150 rpm durante 4 días a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizó un tratamiento en frío de los matraces durante 45 minutos a 4 °C y otros 45 minutos a temperatura ambiente para liberar las zoosporas necesarias para la inoculación de las plantas. A continuación, se filtró el contenido de los matraces a través de una gasa estéril y se recogió el eluido en un matraz Erlenmeyer esterilizado en autoclave. La concentración de zoosporas en el filtrado se obtuvo por recuento en una cámara Malassez y se ajustó a 10<sup>4</sup> zoosporas/mL. Se inocularon las plantas con esta suspensión aplicando 5 mL a la altura del cuello del tallo y se incubaron en condiciones de encharcamiento para favorecer la infección, llenando con agua del grifo las bandejas que contenían los pocillos con las plantas hasta que cubría aproximadamente la mitad de la altura del sustrato. Se realizaron dos experimentos independientes. Las plantas se incubaron en el invernadero y se midieron los síntomas durante 7 días tras la inoculación.

## **6. Medida de los síntomas ocasionados por *Phytophthora capsici***

---

La longitud de las lesiones en el cuello del tallo de plantas inoculadas con *Phytophthora capsici* fueron medidas con un calibre en invernadero para los distintos tratamientos. La infección por *P.capsici* provoca la necrosis en la parte del cuello de la planta, la zona que une

la raíz con el tallo. Esta lesión avanza con el transcurso de la infección, en este ensayo se midió durante los primeros 7 días tras la inoculación con *P.capsici* (dpi, días post-inoculación).

Se emplearon los valores de la longitud de las lesiones necróticas en el cuello del 5°dpi ya que fue en este momento donde se observaron mayores diferencias entre el tratamiento control y el de PO212.

## **7. Preparación de muestras para medida de fenoles solubles totales y ensayos de expresión génica**

---

Se destinaron, para la recogida de muestras, cuatro plantas que conformaban los grupos de los distintos tratamientos. Las muestras correspondían a las raíces, que se introdujeron en tubos con faldón de 12 mL y se conservaron en congelador a -80 °C. Para llevar a cabo las medidas de expresión génica y de contenido en fenoles, se homogeneizaron las muestras en un mortero con nitrógeno líquido, el cual permite un pulverizado homogéneo y mantener la cadena de frío para evitar la degradación del ARN. El polvo obtenido para cada muestra se distribuyó en alícuotas de 500 a 700 mg para la determinación de fenoles solubles totales y de 100 mg para la extracción de ARN, que se almacenaron a -80 °C hasta la realización de los distintos ensayos.

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

---

### **8.1 Extracción de los fenoles**

La extracción de los fenoles se realizó a partir de las alícuotas de 500 a 700 mg de las muestras obtenidas como se mostró en el apartado 7. Se resuspendieron las alícuotas en 1 mL de metanol puro y se incubaron a 70 °C durante 5 minutos. A continuación, se centrifugaron a 20.000 x g durante 1 minuto. Se recogió el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 2 mL y se resuspendió el precipitado en 1 mL de metanol puro. De nuevo, se centrifugó a 20.000 x g durante 1 minuto. Se recogió el sobrenadante, que se mezcló con el obtenido anteriormente. Se repitió el paso anterior tres veces hasta obtener el mayor volumen posible de sobrenadante, que se enrasó a 2 mL con metanol 80%, lo que conformó la muestra para medir el contenido en compuestos fenólicos solubles totales.

### **8.2 Medida de los fenoles**

Los fenoles fueron cuantificados mediante el método de Singleton & Rossi (1965). Para llevar a cabo el cálculo de la cantidad de fenoles presentes en las distintas muestras, se preparó una recta de calibrado con un ácido fenólico, que en este caso fue el ácido gálico. Para realizar la recta patrón se utilizaron cuatro soluciones de ácido gálico en metanol 80%, cuyas concentraciones fueron: 0,01 mg de ácido gálico/mL, 0,02 mg/mL, 0,05 mg/mL y 0,1 mg/mL.

Se prepararon varios tubos Eppendorf de 1,5 mL, uno para el blanco, uno para cada solución de ácido gálico, y uno para cada muestra del experimento. En el tubo del blanco se añadieron 100 µL de metanol 80%. En cada uno de los tubos de la recta de calibrado se añadieron 100 µL de la solución de ácido gálico correspondiente. Para los tubos de las muestras se añadieron 100 µL de la muestra correspondiente. Posteriormente se añadieron 700 µL de agua en cada tubo y 50 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se agitó cada tubo y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 150 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%, se agitó el tubo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último, se ajustó la absorbancia a cero en el espectrofotómetro *UV-3100PC UV-Vis* (VMR) con el blanco y se midió la absorbancia del contenido de los otros tubos a 760 nm.

## 9. Ensayos de expresión génica

---

### 9.1 Extracción de ARN

A partir de las alícuotas de 100 mg de las muestras obtenidas según lo indicado en el apartado 7, se llevó a cabo la extracción del ARN. Para ello, se empleó el kit comercial *E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plant RNA kit* (Omega Biotek) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Con el objetivo de lisar las células, en primer lugar, se añadieron 500 µL de *RB buffer* y 50 µL de 2-mercaptoetanol a los 100 mg de las muestras. Se homogeneizó con un vórtex durante 30 segundos, repitiendo este paso. A continuación, se transfirió el lisado a una columna *Homogenizer Mini Column* insertada previamente en un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos y se descartó la columna.

El lisado se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se añadieron 500 µL de etanol al 70% y se sometió a vórtex durante 20 segundos. Posteriormente, se insertó una columna *HiBind RNA Mini Column* en un nuevo tubo colector de 2 mL y se transfirieron 700 µL de muestra. Se centrifugó a 12.000 g durante 2 minutos. Tras este paso, se descartó el filtrado y se añadieron 500 µL de *RNA Wash Buffer I*. Se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto. Se transfirió la columna *HiBind RNA Mini Column* a un nuevo tubo colector y se añadieron 700 µL de *RNA Wash Buffer II* diluido en etanol absoluto. Se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto. A continuación, se añadieron 500 µL de *RNA Wash Buffer II* y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto. Posteriormente, se centrifugó la columna *HiBind RNA Mini Column* vacía a máxima velocidad durante 2 minutos con el fin de eliminar posibles restos de etanol y secarla. Por último, se transfirió la columna *HiBind RNA Mini Column* a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL, se añadieron 60 µL de agua libre de RNasas y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto para eluir el ARN contenido en la columna, que se conservó a -80 °C.

## 9.2 Síntesis de ADNc

La concentración y calidad del ARN obtenido tras la extracción se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación de absorbancias 260/280 nm en un espectrofotómetro *UV-3100PC UV-Vis* (VMR). Posteriormente, siguiendo las instrucciones de la casa comercial, se procedió a la retrotranscripción del ARN a ADNc con el kit *qScript® cDNA synthesis Kit* (Quantabio). Se conservó el ADNc a -20 °C hasta el análisis de expresión génica.

## 9.3 Medida de la expresión génica por qPCR

Con el ADNc obtenido se llevó a cabo el análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Los distintos análisis fueron realizados en el SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de A Coruña. Los genes estudiados para la cuantificación, relacionados con defensa en pimiento, fueron una peroxidasa (*CaPO1*), una proteína PR1 básica (*CaBPR1*), el gen de la síntesis de etileno (*CaACO*) y una sesquiterpeno ciclasa involucrada en la síntesis de la fitoalexina capsidiol (*CaSCI*). El gen de la actina (*CaACT*) fue usado como gen de referencia para la normalización. Los cebadores utilizados para el proceso de amplificación se muestran en la **Tabla 2**.

La obtención de los valores de expresión relativa se realizó en una hoja de cálculo de Excel, a partir del cálculo de los valores de eficiencia y *Ct* (*Cycle threshold*) con el método de Pfaffl (2001). En este método, la expresión génica relativa se define como:

$$\text{Expresión génica relativa} = \frac{E^{\Delta C t_{\text{diana}}(\text{control-muestra})}}{E^{\Delta C t_{\text{referencia}}(\text{control-muestra})}}$$

dónde *E* es la eficiencia y *Ct* el número de ciclos necesarios para detectar la señal del amplicón.

**Tabla 2.** Cebadores empleados para los estudios de expresión génica por qPCR.

| Gen           | Nº de acceso | Referencia                  | Cebador          |                                | Amplicón |
|---------------|--------------|-----------------------------|------------------|--------------------------------|----------|
|               |              |                             | Nombre           | Secuencia                      |          |
| <i>CaPO1</i>  | AF442386     | García <i>et al.</i> (2015) | <i>CaPO1FW</i>   | 5' ACACTGGAAGCGTGAACAAT 3'     | 333 pb   |
|               |              |                             | <i>CaPO1RV</i>   | 5' CAGCTTGCCTAACATGAAC 3'      |          |
| <i>CaBPRI</i> | AF053343     | Gayoso <i>et al.</i> (2007) | <i>CaBPRIFW</i>  | 5' GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT 3'     | 301 pb   |
|               |              |                             | <i>CaBPRI RV</i> | 5' CAAGCAATTATTTAAACGATCCA 3'  |          |
| <i>CaACO</i>  | AF053075     | García <i>et al.</i> (2018) | <i>CaACOFW</i>   | 5' AGGAGCCTAGGTTTGAAG 3'       | 160 pb   |
|               |              |                             | <i>CaACORV</i>   | 5' CTCCACACCATTAGCAAC 3'       |          |
| <i>CaSCI</i>  | AF061285     | Silvar <i>et al.</i> (2008) | <i>CaSCFW</i>    | 5' GCCTCCTGCTTCTGAATACC 3'     | 312 pb   |
|               |              |                             | <i>CaSCRV</i>    | 5' TTAATATCCTTCCATCCCGACTC 3'  |          |
| <i>CaACT</i>  | AY572427     | Silvar <i>et al.</i> (2008) | <i>CaACTFW</i>   | 5' ATCCCTCCACCTCTTCACTCTC 3'   | 128 pb   |
|               |              |                             | <i>CaACTRV</i>   | 5' GCCTTAACCATTCTGTTCATTATC 3' |          |

## 10. Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos de los datos se emplearon los programas RStudio versión 1.4.1717 y Statgraphics Centurion 19. Para los datos que cumplieran normalidad (longitud de la lesión y cantidad de fenoles solubles totales) se usó un análisis de varianza (ANOVA) con post-hoc de Duncan, mientras que para los datos no paramétricos (expresión génica), se usó un test de Conover de comparación múltiple. El nivel de confianza empleado para cada uno de los estudios fue del 95%.

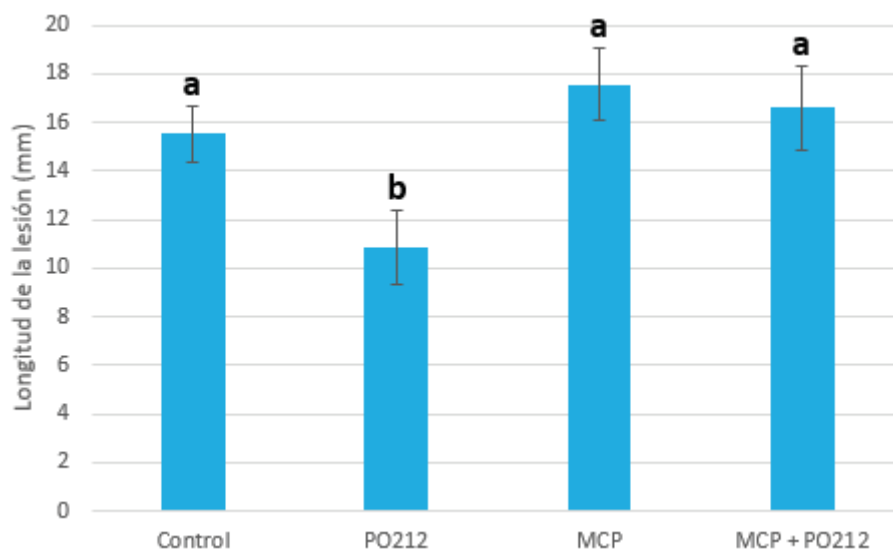


## RESULTADOS

### 1. Ensayo del efecto de la aplicación de MCP en la inducción de resistencia frente a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento

Con el fin de evaluar la severidad de la infección con el patógeno se midió la longitud de la lesión necrótica en el cuello de la raíz que presentaban las plantas de los diferentes tratamientos, como se describe en el apartado *Medida de los síntomas ocasionados por Phytophthora capsici* durante siete días. La longitud de las lesiones necróticas en el cuello de las plantas a los cinco días de la inoculación pone de manifiesto que las plantas del tratamiento con PO212 presentan una reducción de la necrosis causada por la infección con *P.capsici* si se compara con las del tratamiento control.

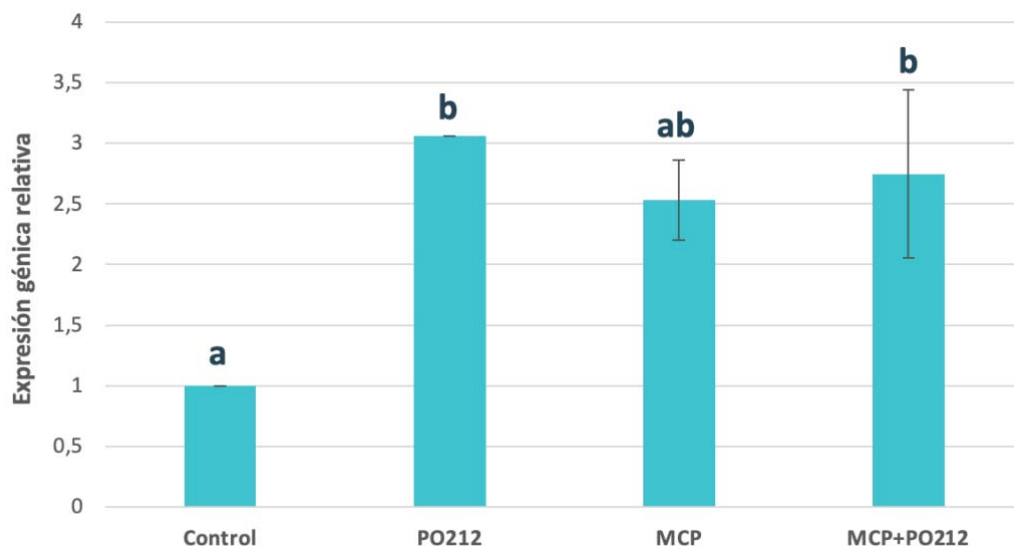
Sin embargo, las plantas tratadas previamente con MCP y tratadas posteriormente con PO212 (MCP + PO212) no muestran una reducción de la necrosis causada por la infección con *P.capsici* con respecto al tratamiento control (**Figura 9**).



**Figura 9.** Longitud de las lesiones necróticas en las plantas control, tratadas con PO212, MCP y MCP junto con PO212 a los 5 días de la inoculación con *Phytophthora capsici*. Se muestran las medias de la longitud en cada tratamiento y el error estándar para dos experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos con un ANOVA y post-hoc Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

## 2. Análisis de expresión de *CaPO1*

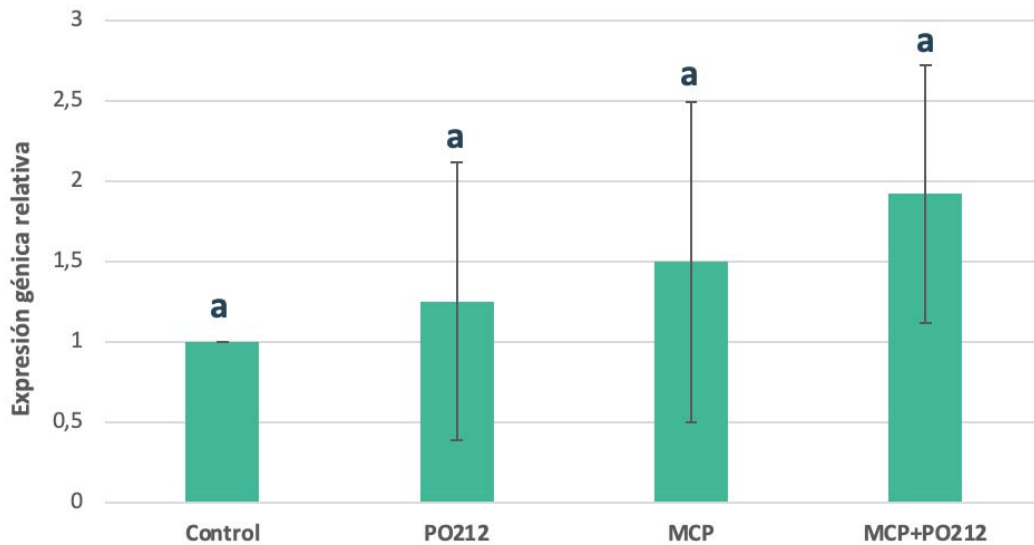
Se llevó a cabo una cuantificación de la expresión del gen *CaPO1*, que codifica para una peroxidasa implicada en la defensa a través del refuerzo de las paredes celulares, con el fin de comprobar la existencia de variaciones debidas al tratamiento con MCP. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de *CaPO1* se ve inducida con PO212 en raíces de pimiento, mientras que con los tratamientos con MCP sólo y combinado con PO212, hay un ligero descenso no significativo (**Figura 10**).



**Figura 10.** Nivel de expresión del gen *CaPO1* en las raíces de plantas control, tratadas con PO212, MCP y MCP junto con PO212. Se muestran las medias de la expresión para el gen en cada tratamiento y el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos con un test de Conover ( $\alpha=0,05$ ).

### 3. Análisis de expresión de *CaBPR1*

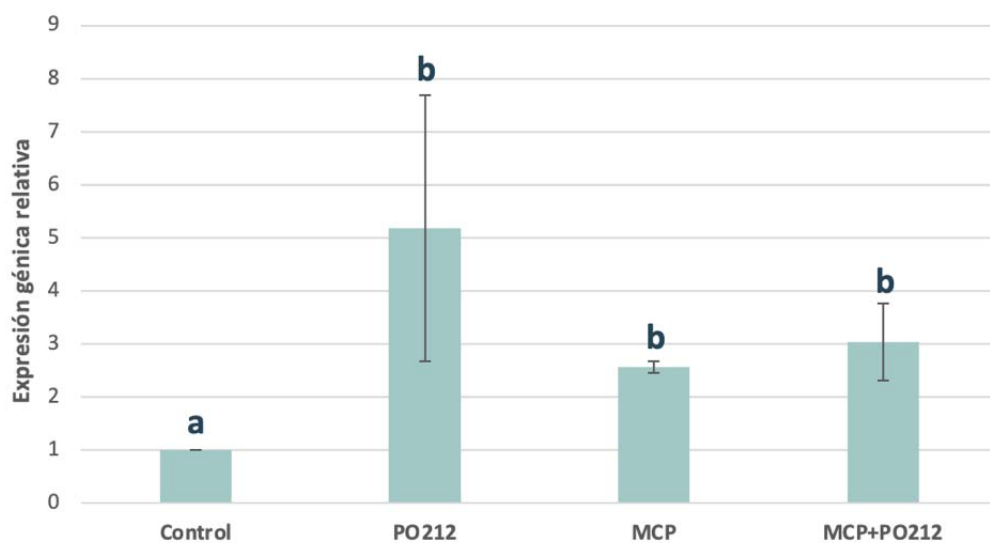
Para analizar posibles variaciones asociadas al tratamiento con MCP, se realizó una cuantificación del nivel de expresión génica del gen *CaBPR1*, que codifica para una proteína PR1 básica implicada en la defensa contra patógenos. Los resultados obtenidos muestran que el nivel de expresión de *CaBPR1* en las raíces de plantas tratadas con MCP sólo y combinado con la inducción de PO212 es ligeramente superior en comparación con el control y el tratamiento con PO212, pero las diferencias observadas no son significativas (**Figura 11**).



**Figura 11.** Nivel de expresión del gen *CaBPR1* en las raíces de plantas control, tratadas con PO212, MCP y MCP junto con PO212. Se muestran las medias de la expresión para el gen en cada tratamiento y el error estándar. Letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas entre grupos con un test de Conover ( $\alpha=0,05$ ).

#### 4. Análisis de expresión de *CaACO*

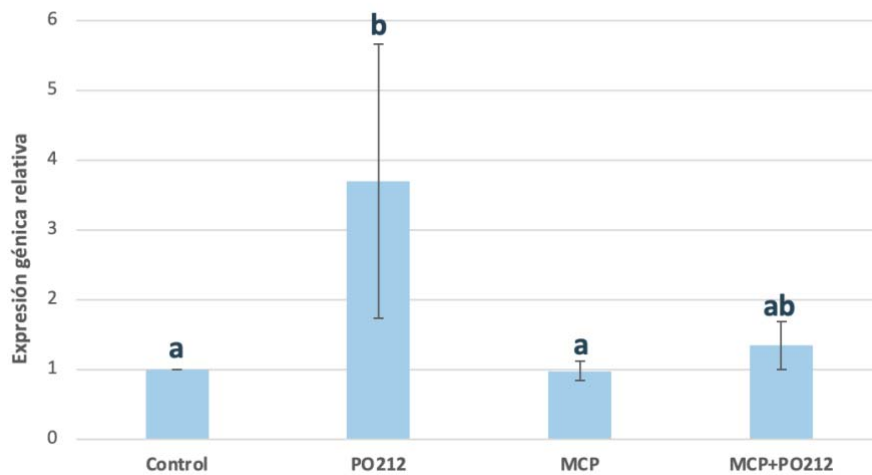
Se llevó a cabo una cuantificación del nivel de expresión génica del gen *CaACO*, que codifica para la ACC oxidasa implicada en la última etapa de síntesis del etileno (Bapat *et al.*, 2010), con el fin de analizar posibles variaciones asociadas al tratamiento con MCP. En la **figura 12** se observa una caída en los niveles de expresión bajo los tratamientos con MCP sólo y combinado con PO212. El mayor nivel de expresión se da en el tratamiento con PO212. Cuando se comparan los correspondientes datos de los niveles de expresión de *CaACO*, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con MCP y el tratamiento con PO212.



**Figura 12.** Nivel de expresión del gen *CaACO* en las raíces de plantas control, tratadas con PO212, MCP y MCP junto con PO212. Se muestran las medias de la expresión para el gen en cada tratamiento y el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos con un test de Conover ( $\alpha=0,05$ ).

## 5. Análisis de expresión de *CaSCI*

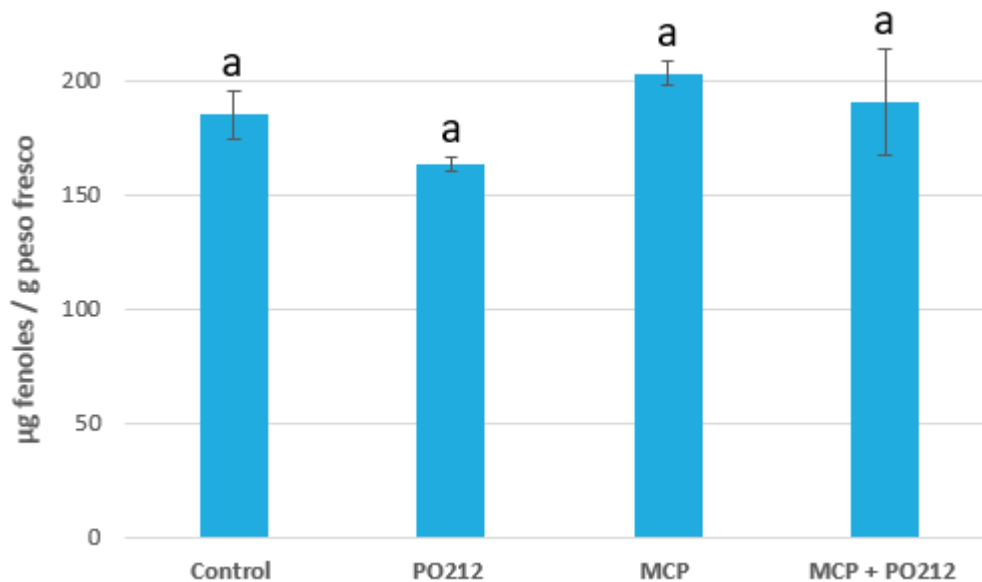
Con el fin de analizar posibles variaciones asociadas al tratamiento con MCP, se llevó a cabo una cuantificación del nivel de expresión génica del gen *CaSCI*, que codifica para una sesquiterpeno ciclasa implicada en la ruta biosintética del capsidiol, la principal fitoalexina producida en pimiento (Silvar *et al.*, 2008). Tal y como se puede observar en la **figura 13**, hay una notable reducción en los niveles de expresión bajo los tratamientos con MCP sólo y combinado con PO212. En el tratamiento con PO212 se da el mayor nivel de expresión como resultado de la inducción. Al comparar los datos de los niveles de expresión de *CaSCI*, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con MCP y el tratamiento con PO212, pero sí al comparar los tratamientos con MCP sólo y con PO212 entre sí.



**Figura 13.** Nivel de expresión del gen *CaSCI* en las raíces de plantas control, tratadas con PO212, MCP y MCP junto con PO212. Se muestran las medias de la expresión para el gen en cada tratamiento y el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos con un test de Conover ( $\alpha=0,05$ ).

## 6. Análisis de fenoles solubles totales

Se midió la cantidad de fenoles solubles totales presentes en las raíces de las plantas sometidas a los distintos tratamientos con MCP y PO212. La cantidad de fenoles solubles está relacionada con la defensa estructural de la planta para lograr detener la expansión del patógeno, ya que la deposición de estos sirve para el refuerzo de las paredes celulares. En consecuencia, una reducción en el nivel de fenoles indica que se está produciendo un refuerzo estructural, el cual constituye una barrera mecánica en la planta. Se observó, con respecto al control, una reducción de los fenoles solubles totales en las raíces de plantas tratadas con PO212, así como un incremento en el tratamiento con MCP sólo, siendo este último inferior si se compara con el tratamiento de las plantas bajo MCP y PO212. No obstante, en ningún caso, las diferencias son estadísticamente significativas (**Figura 14**).



**Figura 14.** Contenido en fenoles solubles en raíces de plantas control, tratadas con PO212, MCP y MCP junto con PO212. Se muestran las medias de la cantidad de fenoles solubles en cada tratamiento y el error estándar para dos experimentos independientes. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre grupos con un ANOVA y post-hoc Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

## DISCUSIÓN

---

En la actualidad, la agricultura persigue alcanzar un reto de gran relevancia a nivel mundial, centrado en la reducción de productos químicos, cuyo uso intensivo ha desencadenado una problemática relacionada con la contaminación de suelos y la aparición de resistencias por parte de distintos grupos de patógenos (Shoresh *et al.*, 2010). Por tanto, resulta fundamental garantizar el rendimiento de la producción agrícola con una gestión rigurosa de las medidas en el control de enfermedades (Duraijaj *et al.*, 2017). La alternativa más desarrollada es el uso de agentes de biocontrol, que mejoran la respuesta defensiva y contribuyen a la protección de las plantas de forma sostenible y efectiva a largo plazo (Borges & Sandalio, 2015; Xue *et al.*, 2013). Sin embargo, las investigaciones realizadas han mostrado la necesidad de ampliar conocimientos en los mecanismos de inducción de resistencia con el fin de ajustar determinados factores como las dosis y frecuencia de aplicación del agente de biocontrol, así como elegir una posible combinación del agente con un producto químico en función del cultivo y necesidades del agricultor (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

En Galicia, el pimiento de Padrón es una hortaliza de gran relevancia económica y muy apreciada entre los consumidores por su textura, sabor y propiedades distintivas, con una demanda que ha incrementado notablemente en los últimos años (Chenlo *et al.*, 2006; Estrada *et al.*, 2000). *Phytophthora capsici* es el patógeno que se considera más destructivo para los cultivos de pimiento de Padrón (García *et al.*, 2018). Para su control, se han empleado fungicidas, cada vez menos efectivos por la aparición de aislados resistentes. De esta forma, para este caso es preciso la investigación y aplicación de estrategias alternativas como la inducción de resistencia mediante agentes de biocontrol como PO212.

PO212 induce resistencia a *Phytophthora capsici* en pimiento de Padrón (Díaz *et al.*, 2015). De Cal *et al.* (2000) demostraron que la aplicación de PO212 es capaz de controlar, durante 100 días, la marchitez y muerte causada por el hongo *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Además, los ensayos realizados por De Cal *et al.* (2008) aplicando PO212 en hojas de fresas afectadas por el hongo *Podosphaera aphanis*, mostraron una marcada reducción en el progreso de la enfermedad en comparación con las que no recibieron el tratamiento. Sucede algo similar con los resultados descritos por Peng & Sutton (1991), que lograron reducir la incidencia de la enfermedad del hongo *Botrytis cinerea* hasta un 90% en fresas (*Fragaria x ananassa* Duch.), aplicando una suspensión de conidios de PO212. En todos los casos mencionados, PO212 supone una alternativa a otros agentes como *Trichoderma harzianum* o *Bacillus subtilis*, que no ofrecen una protección suficiente para una temporada completa si no se aplican en

combinación con un producto químico (Pertot *et al.*, 2008). Cabe destacar, que además de la importancia que conforman las condiciones meteorológicas para la adhesión de las esporas de PO212 a la superficie de la planta, se han descrito numerosos compuestos clave en la inducción de resistencia mediada por PO212, tales como proteínas PR, fenoles, especies reactivas de oxígeno y cambios en los niveles de Calcio (Pascual *et al.*, 2000). La modulación de todos ellos, junto con las rutas de señalización en las que se encuentran implicadas las hormonas, desencadenan las posteriores modificaciones bioquímicas y fisiológicas variables, lo que explica las notables diferencias en la eficacia de la protección según el cultivo (De Cal *et al.*, 1997).

La información disponible sobre el efecto de la inhibición del etileno en la inducción de resistencia por un agente de biocontrol es limitada. Atendiendo a nuestros resultados de la longitud de la lesión necrótica en el tratamiento de PO212 con MCP, se observa una tendencia de incremento en la lesión comparada con el tratamiento sólo con PO212 (**Figura 9**). Según los resultados que se han obtenido en otros estudios con agentes de biocontrol, hay una marcada variabilidad al inhibir las funciones fisiológicas del etileno. Por un lado, existen trabajos que alcanzaron la conclusión de que el etileno no ejerce un efecto notable. Stotz *et al.* (2000) probaron distintos agentes de biocontrol en *Arabidopsis thaliana*, bloqueando la ruta de señalización del etileno frente a las heridas ocasionadas por diversos grupos de insectos. Como resultado, la planta fue capaz de ejercer una respuesta defensiva sin alteraciones. Zhang *et al.* (2012) comprobaron en dátil chino (*Zizyphus jujuba* cv. Huping) que el tratamiento con MCP provoca un incremento en la actividad de enzimas relacionadas con defensa frente al hongo patógeno *Penicillium expansum* causante del moho azul. De la misma forma, en la variedad Hongyang de kiwi (*Actinidia chinensis* cv. Hongyang), un cultivo de gran relevancia económica en numerosas regiones de China se determinó que al aplicar MCP, la respuesta frente al hongo patógeno *Phomopsis* se mantiene inalterada (Xia *et al.*, 2020).

En cambio, Núñez-Pastrana *et al.* (2011) demostraron en plantas de pimiento habanero (*Capsicum chinense*), que el bloqueo de la percepción del etileno provoca mayores daños bajo la infección de *Phytophthora capsici* durante 10 días en comparación con plantas tratadas con aplicación exógena de etileno, que no mostraron síntomas hasta la fase final del experimento. Francia *et al.* (2007) comprobaron en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), que la contribución del etileno resulta fundamental en el proceso de inducción de resistencia frente a *Fusarium oxysporum*. Estos resultados coinciden con el observado anteriormente por Díaz *et al.* (2002), que comprobaron que la aplicación de MCP incrementa la susceptibilidad frente a *Botrytis cinerea* en plantas de tomate.



También en el caso de la inducción de resistencia por micorrizas arbusculares en plantas de tomate, se comprobó que las líneas mutantes insensibles al etileno sufren una mayor marchitez y colonización tisular de la bacteria patógena *Clavibacter michiganensis* (Duc & Posta, 2018). Resulta evidente, dadas las distintas conclusiones observadas en los estudios existentes, que la alteración en la respuesta defensiva al inhibir la acción del etileno depende fundamentalmente del sistema planta-agente de biocontrol empleado y de la posterior interacción con el patógeno. En el caso estudiado en este trabajo el bloqueo de la percepción del etileno usando el inhibidor MCP provoca una disminución de la resistencia inducida por PO212 en plantas de pimiento frente al patógeno *P.capsici*.

En cuanto a la cantidad de fenoles, nuestros resultados muestran que las diferencias entre tratamientos de PO212 sólo y combinado con MCP no son significativas con respecto a los demás. Si bien el patrón obtenido no permite establecer conclusiones claras debido al tamaño muestral, se observó en trabajos anteriores que PO212 reduce la cantidad de fenoles totales (Lois *et al.*, 2018). En este trabajo no se observa una reducción significativa de la cantidad de fenoles en el tratamiento con PO212, aunque sí una tendencia a la baja (**Figura 14**); la ausencia de diferencias significativas podría deberse al reducido tamaño muestral. El aumento de fenoles solubles tras aplicar MCP se ha observado en otros trabajos, cómo por ejemplo, en plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) expuestas a MCP, donde los niveles de fenoles incrementan, haciendo a las plantas más vulnerables ante al ataque de herbívoros y patógenos (Saltveit, 2004). De la misma forma, según Amoah & Terry (2018), con el tratamiento con MCP en patata dulce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) se mantienen unos niveles elevados de fenoles, lo que deja las raíces más debilitadas y expuestas a patógenos. Esto se debe a que el etileno induce la actividad de las peroxidadas, que están implicadas en la oxidación de los fenoles para formar las ligninas que producen el reforzamiento de la pared celular, una barrera crucial para impedir la invasión del patógeno en la planta (Zhang *et al.*, 2012).

Los resultados sobre la expresión del gen *CaPO1*, una peroxidasa implicada en defensa, concuerdan con los niveles de fenoles solubles, tal y como se esperaba dada la correlación existente entre la actividad peroxidasa y los niveles de fenoles en pimiento (Candela *et al.*, 1995). Se aprecia que PO212 induce la expresión de esta peroxidasa, al igual que lo observado por Abbattista *et al.* (1988) en plantas de tomate, donde una mayor expresión de peroxidadas por PO212 mejora la defensa frente a *Fusarium oxysporum*. Además, esta inducción de peroxidadas se ha observado también en palmeras (*Phoenix dactylifera*) sometidas a un tratamiento con micorrizas arbusculares.

De esta forma, las palmeras controlan con éxito el ataque de *Fusarium oxysporum* y presentan una altura, integridad tisular y biomasa adecuadas (Jaiti *et al.*, 2007). Por otra parte, al aplicar MCP, la expresión de *CaPO1* en el tratamiento MCP+PO212 no se ve modificada en comparación con el tratamiento de PO212 (**Figura 10**). Es posible que el MCP afecte a la velocidad con la que *CaPO1* es inducida por PO212.

Silvar *et al.* (2008) observó que en plantas de pimiento de Padrón infectadas con *Phytophthora capsici* se produce un incremento rápido a las 8 horas de la expresión de *CaPO1*. Sin embargo en nuestro ensayo las muestras fueron tomadas antes de la inoculación con *P.capsici* siendo necesario comprobar si el MCP reduce la expresión a las 8 horas tras la inoculación con *P.capsici*. Por tanto, la expresión de *CaPO1* sigue siendo activada por PO212 incluso bloqueando la percepción del etileno con MCP, pero podría estar haciéndolo de una manera más lenta que haga que la respuesta de resistencia no sea eficaz.

En estudios anteriores se observó que PO212 induce la expresión de gen de la proteína básica PR1, *CaBPR1*, a las 48 horas tras el tratamiento con PO212 en plantas de pimiento de Padrón (Lois, 2019). Por el contrario, en este trabajo no se observó una inducción de la expresión de *CaBPR1* tras el tratamiento con PO212 comparado con el control (**Figura 11**). En este trabajo las muestras fueron tomadas a las 24 horas tras el tratamiento con PO212 por lo que puede ser demasiado temprano para observar la sobreexpresión de *CaBPR1*.

El gen *CaACO*, responsable de la producción de etileno, aumenta su expresión tras el tratamiento con PO212 (**Figura 12**). Esta correlación, indica un papel regulador del etileno en la respuesta de la planta a PO212. La aplicación de MCP previa al tratamiento con PO212 (MCP+PO212) produce una tendencia a la baja de la expresión de *CaACO*, aunque de manera no significativa (**Figura 12**). Esto puede deberse a la retroalimentación negativa que muestra *CaACO* a la cantidad de etileno. Es decir, cuanto menos etileno más se induce la expresión de *CaACO*. Esto es característico de los genes de biosíntesis de hormonas para mantener un nivel constante de dichas hormonas. El tratamiento con MCP inhibe la percepción del etileno y esto hace que la planta no sea capaz de detectar los niveles de etileno y por ello se activa la producción de más etileno, tal y como se observa en el tratamiento únicamente con MCP (**Figura 12**). Por lo tanto, la expresión de *CaACO* en el tratamiento MCP+PO212 puede estar desconectado de la respuesta de resistencia y deberse únicamente a la retroalimentación intrínseca de este gen.

Al igual que *CaACO*, *CaSC1* es sobreexpresado en pimiento en respuesta al tratamiento con PO212. La sobreexpresión de *CaSC1* se ha observado para otros agentes de biocontrol, como es el caso de *Trichoderma viride* en pimiento frente a *Phytophthora capsici* (García-Pineda & Lozoya-Gloria, 1999). *CaSC1* es el gen responsable de la síntesis de la principal fitoalexina de pimiento, el capsidiol, una sustancia que es tóxica para muchos patógenos y que se relaciona directamente con los procesos defensivos. En los resultados presentados en este trabajo la expresión de *CaSC1* inducida por PO212 se ve inhibida por el tratamiento con MCP (**Figura 13**) lo que indica un papel importante del capsidiol en la respuesta de defensa inducida por PO212 en plantas de pimiento.

En resumen, los resultados del presente trabajo demuestran que la respuesta de defensa inducida por PO212 se ve inhibida por el MCP y que algunas de las respuestas fisiológicas que induce PO212 en pimiento se ven inactivadas por este inhibidor de la respuesta del etileno. Por ello, sería de gran interés continuar las investigaciones mediante un estudio adicional con un mayor tamaño muestral o modificando condiciones experimentales, para alcanzar una respuesta en los análisis que permita verificar la tendencia.

## CONCLUSIONES

---

- La inhibición de la percepción del etileno aplicando 1-metilciclopropeno (MCP) a las plantas de pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón) reduce la resistencia inducida por PO212 frente al patógeno *Phytophthora capsici*.
- El 1-metilciclopropeno (MCP) reduce la expresión del gen de biosíntesis de la fitoalexina capsidiol (*CaSCI*) pero no otros factores fisiológicos asociados a la respuesta inducida por PO212 en pimiento de Padrón.

## CONCLUSIÓNS

---

- A inhibición da percepción do etileno aplicando 1-metilciclopropeno (MCP) ás plantas de pemento de Padrón (*Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón) reduce a resistencia inducida por PO212 fronte ao patóxeno *Phytophthora capsici*.
- O 1-metilciclopropeno (MCP) reduce a expresión do xen de biosíntesis da fitoalexina capsidiol (*CaSCI*) pero non outros factores fisiolóxicos asociados á resposta inducida por PO212 en pemento de Padrón.

## CONCLUSIONS

---

- The inhibition of ethylene perception by 1-methylcyclopropene (MCP) application to Padrón pepper plants (*Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón) reduces the resistance induced by PO212 against the pathogen *Phytophthora capsici*.
- 1-methylcyclopropene (MCP) reduces the expression of the phytoalexin capsidiol biosynthesis gene (*CaSCI*) but not other physiological factors associated with the response induced by PO212 in Padrón pepper.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Abbattista, I., Ferraris, L., & Matta, A. (1988). Variations of phenoloxidase activities as a consequence of stresses that induce resistance to *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, 122, 45-53.
- Aerts, N., Pereira Mendes, M., & Van Wees, S. C. M. (2021). Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense. *The Plant Journal*, 105, 489-504.
- Amoah, R. S., & Terry, L. A. (2018). 1-Methylcyclopropene (1-MCP) effects on natural disease resistance in stored sweet potato. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 4597-4605.
- Bapat, V. A., Trivedi, P. K., Ghosh, A., Sane, V. A., Ganapathi, T. R., & Nath, P. (2010). Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances*, 28, 94-107.
- Bari, R., & Jones, J. D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69, 473-488.
- Borges, A. A., & Sandalio, L. M. (2015). Induced resistance for plant defense. *Frontiers in Plant Science*, 6, 109.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2000). Biochemistry and molecular biology of plants. 2nd ed. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons Inc.
- Candela, M. E., Alcazar, M. D., Espín, A., Egea, C., & Almela, L. (1995). Soluble phenolics acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*, 44, 116-123.
- Čerekovic, N., & Poltronieri, P. (2017). Plant signaling pathways activating defence response and interfering mechanisms by pathogen effectors, protein decoys and bodyguards. *AIMS Molecular Science*, 4, 370-388.
- Chenlo, F., Chaguri, L., Santos, F., & Moreira, R. (2006). Osmotic dehydration/impregnation kinetics of Padrón pepper (*Capsicum annuum* L. *Longum*) with sodium chloride solutions: process modelling and colour analysis. *Food Science and Technology International*, 12, 221-227.
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B.N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 289-297.
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., & Staskawicz, B. J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 341, 746-751.

- David, L., Harmon, A. C., & Chen, S. (2019). Plant immune responses – from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens. *Plant Signaling & Behavior*, 14, e1588667.
- De Cal, A., Redondo, C., Szejnberg, A., & Melgarejo, P. (2008). Biocontrol of powdery mildew by *Penicillium oxalicum* in open-field nurseries of strawberries. *Biological Control*, 47, 103-107.
- De Cal, A., García-Lepe, R., & Melgarejo, P. (2000). Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Histological studies of infected and induced tomato stems. *Phytopathology*, 90, 260-268.
- De Cal, A., Pascual, S., & Melgarejo, P. (1997). Involvement of resistance induction by *Penicillium oxalicum* in the biocontrol of tomato wilt. *Plant Pathology*, 46, 72-79.
- Díaz, J., Lois, M., Núñez, R., Larena, I., & Veloso, J. (2015). PO212 induces resistance against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici* in pepper. XIV Congreso de la SEF. Toledo (Spain).
- Díaz, J., Have, A. T., & Van Kan, J. A. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance to tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 129, 1341-1351.
- Dmitriev, A. P. (2003). Signal molecules for plant responses to biotic stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50, 465-474.
- Duc, N. H., & Posta, K. (2018). Mycorrhiza-induced alleviation of plant disease caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* and role of ethylene in mycorrhiza-induced resistance in tomato. *Acta Biologica Hungarica*, 69, 170-181.
- Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J. H., Chang, W. S., Park, Y. J., Senthilkumar, P., Choi, K. M., Lee, J. H., & Oh, B. T. (2017). Potential for plant biocontrol activity of isolated *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus stratosphericus* strains against bacterial pathogens acting through both induced plant resistance and direct antagonism. *FEMS Microbiology Letters*, 23, 364.
- Espeso, E. A., Villarino, M., Carreras, M., Alonso-Guiraldo, L., Alonso, J. M., Melgarejo, P., & Larena, I. (2019). Altered nitrogen metabolism in biocontrol strains of *Penicillium rubens*. *Fungal Genetics and Biology*, 132, 103263.
- Estrada, B., Bernal, M. A., Díaz, J., Pomar, F., & Merino, F. (2000). Fruit development in *Capsicum annum*: Changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6234-6239.

- Estrada, B., Pomar, F., Díaz, J., Merino, F., & Bernal, M. A. (1998). Effects of mineral fertilizer supplementation on fruit development and pungency in Padrón peppers. *The Journal of Horticulture Science and Biotechnology*, 73, 493-497
- FAO (2020). Disponible en el siguiente enlace: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>  
Última consulta: 10/07/21.
- Finkina, E. I., & Ovchinnikova, T. V. (2018). Plant defensins: structure, functions, biosynthesis, and the role in immune response. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 44, 261-278.
- Francia, D., Demaria, D., Calderini, O., Ferraris, L., Valentino, D., Arcioni, S., Tamietti, G., & Cardinale, F. (2007). Wounding induces resistance to pathogens with different lifestyles in tomato: role of ethylene in cross-protection. *Plant, Cell & Environment*, 30, 1357-1365.
- García, T., Gutiérrez, J., Veloso, J., Gago-Fuentes, R., & Díaz, J. (2015). Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. *Journal of Plant Physiology*, 176, 202-209.
- García, T., Veloso, J., & Díaz, J. (2018). Properties of vanillyl nonanoate for protection of pepper plants against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 150, 1091-1101.
- García-Pineda, E., & Lozoya-Gloria, E. (1999). Induced gene expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC oxidase) in pepper (*Capsicum annuum* L.) by arachidonic acid. *Plant Science*, 145, 11-21.
- Gayoso, C., de Ilárduya, O., Pomar, F., & Merino de Cáceres, F. (2007). Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahlia* in different Solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 199-209.
- Gayoso, C., Pomar, F., Merino, F., & Bernal, M. A. (2003). Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae*, 102, 1-13.
- González-Pérez S., Garcés-Claver, A., Mallor, C., Sáenz de Miera, L. E., Fayos, O., Pomar, F., Merino, F., & Silvar, C. (2014). New insights into *Capsicum* spp relatedness and the diversification process of *Capsicum annuum* in Spain. *PLoS ONE*, 9, e116276.
- Hanley, M. E., Lamont, B. B., Fairbanks, M. M., & Rafferty, C. M. (2007). Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 8, 157-178.

- Hernández-Pérez, T., Gómez-García, M. R., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2020). *Capsicum annuum* (hot pepper): an ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical. A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19, 2972-2993.
- Jaiti, F., Meddich, A., & El Hadrami, I. (2007). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71, 166-173.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
- Koç, E., Üstun, A. S., Islek, C., & Arici, Y. K. (2011). Defense responses in leaves of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars infected with different inoculum concentrations of *Phytophthora capsica* Leon. *Scientia Horticulturae*, 128, 434-442.
- Li, P., Lu, Y. J., Chen, H., & Day, B. (2020). The lifecycle of the plant immune system. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39, 72-100.
- Lois, M. (2019). Induction of resistance in pepper against *Verticillium dahlia* by the application of PO212. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña. Tesis doctoral.
- Lois, M., Fernández, N., Veloso, J., García, T., Pastor, V., Flors, V., Larena, I., & Díaz, J. (2018). PO212 induced resistance in pepper: new insights on phenolic defense responses. XIX Congreso de la SEF. Toledo (Spain).
- López-Hernández, J., Oruña-Concha, M. J., Simal-Lozano, J., Vázquez-Blanco, M. E., & González-Castro, M. J. (1996). Chemical composition of Padrón peppers (*Capsicum annuum* L.) grown in Galicia (N.W. Spain). *Food Chemistry*, 57, 557-559.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., & Ton, J. (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, 183-193.
- Majid, M. U., Awan, M. F., Fatima, K., Tahir, M. S., Ali, Q., Rashid, B., Rao, A. Q., Nasir, I. A., & Husnain, T. (2016). *Phytophthora capsici* on chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) and its management through genetic and biocontrol: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 103, 419-430.
- MAPA (2019). Superficies y producciones anuales de cultivo de acuerdo con el reglamento (CE) 543/2009. Anuario Estadísticas. Disponible en el siguiente enlace: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/> Última consulta: 10/07/21.
- Marcec, M. J., Gilroy, S., Poovaiah, B. W., & Tanaka, K. (2019). Mutual interplay of Ca<sup>2+</sup> and ROS signaling in plant immune response. *Plant Science*, 283, 343-354.



- Mo, H., Kim, S., Wai, K. P. P., Siddique, M. I., Yoo, H., & Kim, B. S. (2014). New sources of resistance to *Phytophthora capsici* in *Capsicum* spp.. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 55, 50-55.
- Molinari, S., & Leonetti, P. (2019). Biocontrol agents activate plant immune response and prime susceptible tomato against root-knot nematodes. *PLoS ONE*, 14, e0213230.
- Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, 38, 433-449.
- Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., & Kareem, A. (2020). Modulation of plant defense system in response to microbial interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1298.
- Núñez-Pastrana, R., Arcos-Ortega, G. F., Souza-Perera, R. A., Sánchez-Borges, C. A., Nakazawa-Ueji, Y. E., García-Villalobos, F. J., Guzmán-Antonio, A. A., & Zúñiga-Aguilar, J. J. (2011). Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper. *European Journal of Plant Pathology*, 131, 669-683.
- Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198, 249-266.
- Oliveira, M. D. M., Varanda, C. M. R., & Félix, M. R. F. (2016). Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters*, 15, 152-158.
- Panpatte, D. G., Jhala, Y. K., & Vyas, R. V. (2020). Signaling pathway of induced systemic resistance. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, 10, 133-141.
- Pascual, S., De Cal, A., Magan, N., & Melgarejo, P. (2000). Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged culture. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 847-853.
- Peng, G., & Sutton, J. C. (1991). Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 13, 247-257.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D. M., Piperno, D. R., ... & Zeidler, J. A. (2007). Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 315, 986-988.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, e45.

- Pertot, I., Zasso, R., Amsalem, L., Baldessari, M., Angeli, G., & Elad, Y. (2008). Integrating biocontrol agents in strawberry powdery mildew control strategies in high tunnel growing systems. *Crop Protection*, 27, 622-631.
- Piccini, C., Parrotta, L., Faleri, C., Romi, M., Del Duca, S., & Cai, G. (2019). Histomolecular responses in susceptible and resistant phenotypes of *Capsicum annuum* L. infected with *Phytophthora capsici*. *Scientia Horticulturae*, 244, 122-133.
- Pomar, F., Bernal, M. A., Collar, J., Díaz, J., Caramelo, C., Gayoso, C., Novo, M., Prego, C., Saavedra, A., Silvar, C., & Merino, F. (2001). A survey of “tristeza” of pepper in Galicia and the fungal pathogens causing the disease. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 20, 90-93.
- Rigueiro Messa, V. (2021). Biocontrol by induced systemic resistance using plant growth promoting rhizobacteria. *Rhizosphere*, 17, 100323.
- Rivera Martínez, A., Andrés Ares, J. L., Rodríguez Bao, J. M & Fernández Paz, J. (2003). Pimientos autóctonos de Galicia: Caracterización morfológica y tolerancia frente a *Phytophthora capsici*. XXXIII Seminario de Técnicos y Especialistas en Horticultura.
- Saltveit, M. E. (2004). Effect of 1-methylcyclopropene on phenylpropanoid metabolism, the accumulation of phenolic compounds, and browning of whole and fresh-cut “iceberg” lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 34, 75-80.
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L’Haridon, F., & Métraux, J. P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 5, 274.
- Silvar, C., Merino, F., & Díaz, J. (2008). Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1120-1124.
- Silvar, C., Merino, F., & Díaz, J. (2006). Diversity of *Phytophthora capsici* in Northwest Spain: Analysis of virulence, metalaxyl response, and molecular characterization. *Plant Disease*, 90, 1135-1142.
- Silvar, C., Duncan, J. M., Cooke, D. E. L., Williams, N. A., Díaz, J., & Merino, F. (2005). Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsica* Leon. *European Journal of Plant Pathology*, 112, 43-52.
- Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 21-43.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-458.

- Stotz, H. U., Pittendrigh, B. R., Kroymann, J., Weniger, K., Fritsche, J., Bauke, A., & Mitchell-Olds, T. (2000). Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of *Arabidopsis* against cotton worm but not diamondback moth. *Plant Physiology*, 124, 1007-1017.
- Thaboub, M. B., Sanogo, S., Wosland, P. W., & Murray, L. (2008). Heat level in chile pepper to root and fruit infection by *Phytophthora capsici*. *HortScience*, 43, 1846-1851.
- van Loon, L. (2008). Manipulating the plant's innate immune system by inducing resistance. *Phytoparasitica*, 36, 103-106.
- van Loon, L., Geraats, B. P. J., & Linthorst, H. J. M. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 11, 184-191.
- Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., Aarland, R. C., & Rodríguez-Sahagún, A. (2020). Rhizospheric bacteria with potential benefits in agricultura. *Terra Latinoamericana*, 38, 333-345.
- Villarino, M., De Cal, A., Melgarejo, P., Larena, I., & Espeso, E. (2016). The development of genetic and molecular markers to register and commercialize *Penicillium rubens* (formerly *Penicillium oxalicum*) strain 212 as a biocontrol agent. *Microbial Biotechnology*, 9, 89-99.
- Wu, S., Shan, L., & He, P. (2014). Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Science*, 228, 118-126.
- Xue, Q. Y., Ding, G. C., Li, S. M., Yang, Y., Lan, C. Z., Guo, J. H., & Smalla, K. (2013). Rhizocompetence and antagonistic activity towards genetically diverse *Ralstonia solanacearum* strains – an improved strategy for selecting biocontrol agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1361-1371.
- Zehra, A., Dubey, M. K., Meena, M., Aamir, M., Patel, C. B., & Upadhyay, R. S. (2018). Role of *Penicillium* species in biorremediation processes. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, 14, 247-260.
- Zhang, Z., Tian, S., Zhu, Z., Xu, Y., & Qin, G. (2012). Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and resistance of jujube (*Zizyphus jujuba* cv. Huping) fruit against postharvest disease. *Food Science and Technology*, 45, 13-19.