



Universitat de València

Facultat de Ciències Biològiques

Mecanismos de respuesta frente a la infección por *Botrytis cinerea* en *Solanum lycopersicum*. Estudio de las β -1,4-endoglucanasas y de tratamientos inductores



M^a de la O Leyva Pérez

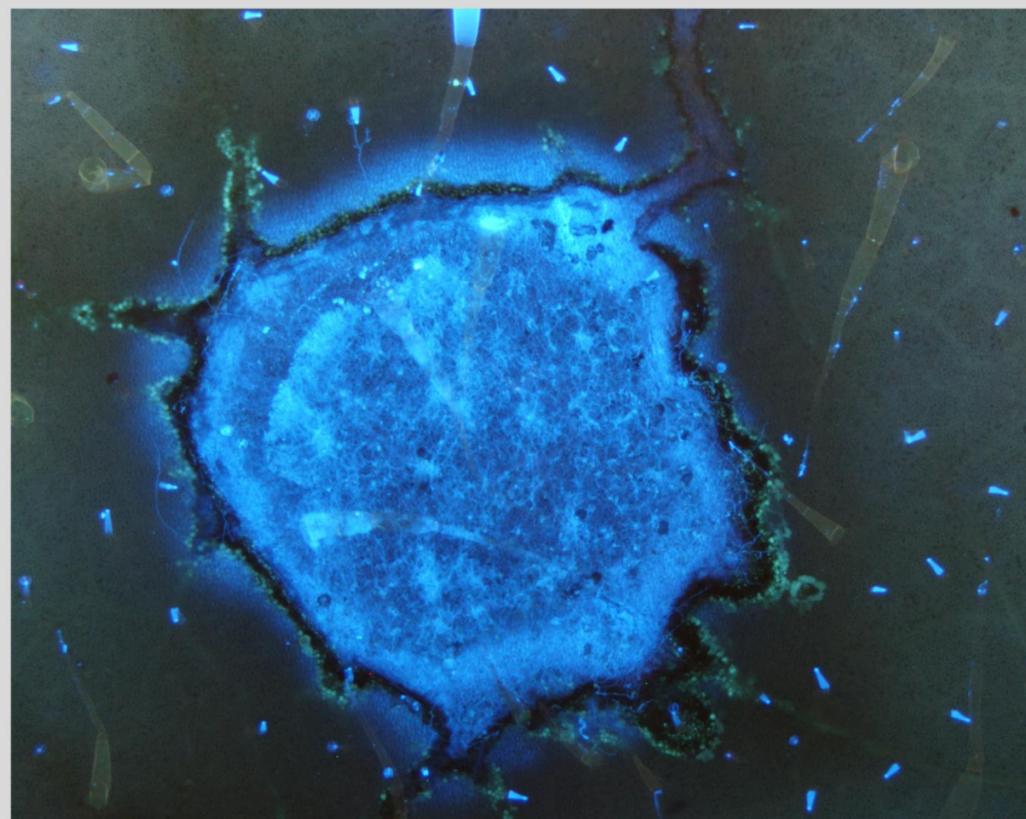
Tesis Doctoral, 2008

Tesis Doctoral

M^a de la O Leyva Pérez

2008

Botrytis cinerea es un hongo patógeno que causa serias pérdidas económicas en varios cultivos, entre ellos, el tomate (*Solanum lycopersicum*). La aplicación de fungicidas es una práctica habitual para controlar las fitopatologías fúngicas, pero la preocupación por las posibles consecuencias para la salud pública y para el medio ambiente ha generado la necesidad de buscar alternativas. Como parte de esta tesis, se ha caracterizado la capacidad fungicida contra *B. cinerea* de un derivado del ácido adípico, un compuesto que se utiliza como aditivo alimentario. Por otra parte, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa en respuesta al ataque de microorganismos patógenos. La potenciación de las defensas naturales de las plantas constituye actualmente una atractiva alternativa al uso de fungicidas. El estudio que se describe en esta tesis doctoral sobre las β -1,4-endoglucanasas de tomate, *Cel1* y *Cel2*, apoya la idea de que la pared celular no constituye sólo una barrera física, sino que además actúa como una defensa activa contra los patógenos. Asimismo, sugiere que los enzimas implicados en el metabolismo de la pared celular juegan un papel en la susceptibilidad del tomate frente a *B. cinerea*. Finalmente, se ha investigado la eficacia y el modo de acción del ácido hexanoico como inductor de las defensas de las plantas. Los resultados obtenidos sugieren que este compuesto presente en las plantas, podría formar parte de nuevas estrategias para el control de *B. cinerea* en tomate.



Departament de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat de València.



Departamento de Biotecnología.
Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos.



**Mecanismos de respuesta frente a la infección
por *Botrytis cinerea* en *Solanum lycopersicum*.
Estudio de las β -1,4-endoglucanasas y de
tratamientos inductores**



Trabajo realizado por M^a DE LA O LEYVA PÉREZ en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València y en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, para optar al grado de Doctora en Biología.



Valencia, Septiembre de 2008

CARMEN GONZÁLEZ BOSCH, doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València

CERTIFICA que la presente Tesis Doctoral titulada "Mecanismos de respuesta frente a la infección por *Botrytis cinerea* en *Solanum lycopersicum*. Estudio de las β -1,4-endoglucanasas y de tratamientos inductores" ha sido realizada por la Licenciada en Biología, M^a de la O Leyva Pérez, bajo su dirección en su laboratorio del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.

Valencia, Septiembre de 2008

Fdo: Carmen González Bosch

Agradecimientos

En estas líneas pretendo mostrar mi agradecimiento a aquellas personas que han participado en este periodo académico de mi vida. Esta memoria no sería completa si no manifestara lo importantes que han sido en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, que también les pertenece a ellos.

A mis padres, Mari Pérez y Antonio Leyva, que siempre me han animado a estudiar y viven para ayudarme a cumplir mis sueños. Si he llegado a escribir este libro es, sin duda, por ellos.

A Tony, un gran científico, mi mejor amigo, mi inspiración. Aprovecho este libro para publicar lo orgullosa que estoy de que tú seas mi hermano. Siempre serás mi ejemplo a seguir.

A mi directora, Carmen González Bosch. Es casi imposible expresar con palabras la buena fortuna que tuve de que decidieses hacer de mí una investigadora, a la búsqueda de la interacción planta-patógeno. Para ello has derrochado tu sabiduría, tu paciencia y tu tiempo conmigo y creo que he aprendido mucho. Gracias por ayudarme durante más de cuatro años, por encima de tus obligaciones como directora. La verdad es que ha sido un placer.

A Loles Real, la maestra de mis *western blots*. Siempre accesible, siempre ingeniosa. Espero que repitamos a hacer cosas juntas. Mi agradecimiento también es para las otras amigas del departamento de genética, para Camila, Inma y Carolina.

A Pilar García Agustín. Sobra decir que sin la colaboración contigo y con tu laboratorio esta tesis habría sido distinta. Pienso que además de colaborar en la investigación nos hemos divertido. Gracias por todo.

A mi compañera desde el inicio de esta tesis, Begonya Vicedo. Sabía que trabajaría contigo y esa fue una de las razones por las que empecé en el 304. No sé como agradecer todo lo que me has enseñado directamente en la bancada, colaborando como compañeras y amigas aunque en realidad tú eras la profesora y yo la estudiante. *Gracies, Merci*...Lo que quiero es expresarte mi respeto como investigadora y como persona. Tuve suerte al tenerte de compañera.

A Victor Flors, que me ha prestado su ayuda y su experiencia.

A los otros compañeros del departamento de ciencias experimentales de la Universidad Jaume I. A Gemma del Amo, a Gemma Camañes, a Maria y a Victoria. Siempre habeis estado dispuestas a hecharme una mano cuando iba allí. Muchas gracias.

A lo mejor que obtuve de la Facultad de Ciencias Biológicas. A Raquel, a Cristina, a Toñi, a Bea, a Inma, a Patricia y a M^a José. Gracias por seguir ahí, animándome y haciéndome partícipe de vuestra amistad con especial mención a Raquel, que me ha acompañado y ayudado desde el primer día que pisé la facultad, aunque no había clase.

A mis amigas-hermanas desde el colegio. A Ruth y a Susana, que incluso me habeis ayudado en la revisión de las citas bibliográficas. A Silvia, a Natalia y a Rosa. Sé que todas habeis seguido mi tesis de cerca. Gracias por aguantarme, por los buenos y malos ratos compartidos, por animarme, por apoyarme, en definitiva, por ser mis amigas.

A todo el personal del IATA. A Fran, a Alí, a Viky, a Lorena, a Carlos Benito...y a todos los compañeros de la tercera planta. A Paqui y JoseAntonio, a Amalia, a Amparo Querol, a Carmela, a David, a Silvia, a Roseta, a Patricia...Gracias por los seminarios, de los cuales se aprende mucho. Gracias por tender una mano amable siempre que aparezco por algún laboratorio para pedir algún aparato, reactivo, etc.

A Rafa, por haberme acompañado los primeros años de tesis.

A Emilia Matallana, por haberme impulsado a hacer la tesis doctoral. Ha sido un privilegio haberte tenido de profesora en primer curso, haber trabajado contigo y haber contado contigo desde que entré en el IATA. Gracias infinitas.

A los compañeros que me dieron ganas de hacer la tesis: A Roberto Pérez, el primero que me enseñó a cargar un gel de Agarosa. A Agustín Aranda, que me enseñó a medir DNA. A Fernando Cardona, que me enseñó a hacer viabilidad. A Geno Uber, que me enseñó a medir glucosa y a extraer plásmidos. A Elena Garre, mi apoyo desde el primer día en el IATA cuando me acogisteis Roberto y tu en vuestra *casita* hasta la fecha. Eres una gran doctora en Biología, gran persona y objeto de mi admiración incondicional. Gracias por tu amistad.

A los compañeros que me he encontrado por el Camino: A Miguel, uno de los mejores técnicos que he conocido. A Bárbara, cuya personalidad me encantó. A Marisa; Conseguiste leer la tesis antes que yo y también conseguiste junto con Laura hacerme sentir como en mi segunda casa, Andalucía.

A los compañeros que han venido después: A Rocio y Celia, las jóvenes promesas de la ciencia. A Laura, el otro mejor técnico que he conocido. Sois la sal y el azúcar del 302-304. Sin vosotras me habría desmayado en las etapas finales.

A mi compañero de tesis y mi relevo, Ivan Finiti. Tenerte en el laboratorio ha sido un soplo de aire fresco con olor a albahaca. Gracias por estar siempre al otro lado más cercano de mi rincón del laboratorio, por ser tan espontáneo, por tu humor, tan italiano-español. Pienso que hacemos un buen equipo y que serás un gran investigador.

A los que han venido al final y que no he tenido la oportunidad de conocer tan bien pero lo suficiente como para ofrecerles mi amistad y mi agradecimiento: A Ana, a Javi, a Joví, a Antonio y a Paco.

Cada uno de Vosotros en diferente medida habeis sido mi libro de texto y mi apoyo. Gracias por ser como sois, porque siempre hay alguien en el laboratorio y por haber hecho del 302-304 un segundo hogar para mí.

A nuestros estudiantes colaboradores, Jaime y Carlos, que como me han pillado en la etapa final de escritura no les he hecho mucho caso.

A Susi y a Kety. La alegría de mi casa.

La realización de esta tesis doctoral se ha llevado a cabo gracias a una Beca predoctoral BIO3-11 asociada a proyecto de la Universidad de Valencia (específica 20030757) de tres años de duración y a una beca Fundación Caixa Castelló- Bancaixa para investigación de un año de duración.

Algunas abreviaturas utilizadas en la redacción de esta tesis:

| | |
|---------------|------------------------------------|
| EGasa | Endoglucanasa |
| h.p.i. | Horas post-inoculación |
| d.p.a. | Días post-antesis |
| RT | Temperatura de laboratorio |
| HR | Respuesta hipersensible |
| OGAs | Ologalacturónidos |
| JA | Ácido jasmónico |
| SA | Ácido salicílico |
| ET | Etileno |
| MeJa | Metil jasmonato |
| SE | Error estándar |
| PDB | Caldo de patata dextrosado |
| PDA | Agar de caldo de patata dextrosado |
| h. | Horas |
| M. | Molar |
| mM. | Milimolar |
| PAL | Fenilalanina amonioliasa |
| ICS | Isocorismato sintasa |
| TMV | Virus del mosaico del tabaco |
| TCV | Virus del arrugado del navo |
| TNV | Virus de la necrosis del tabaco |

INTRODUCCIÓN GENERAL

LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

| | |
|--|-----------|
| Los patógenos de plantas | (pag. 1) |
| <i>Botrytis cinerea</i> , un modelo de necrotrofia | (pag. 3) |
| Los mecanismos de defensa inducibles de las plantas | (pag. 6) |
| • El reconocimiento del patógeno | (pag. 7) |
| <i>GenesR. Modelo gen-a-gen</i> | (pag. 7) |
| <i>Hipótesis del guardián</i> | (pag. 10) |
| <i>MAMPs</i> | (pag. 12) |
| <i>Teoría del zigzag</i> | (pag. 14) |
| • Respuestas tempranas tras el reconocimiento del patógeno | (pag. 15) |
| <i>El estallido respiratorio</i> | (pag. 15) |
| <i>Las cascadas de fosforilación</i> | (pag. 16) |
| <i>La respuesta hipersensible (HR)</i> | (pag. 17) |
| • La transducción de la respuesta mediante señalización hormonal | (pag.17) |
| <i>Ruta del ácido salicílico</i> | (pag. 18) |
| <i>Ruta del ácido jasmónico</i> | (pag. 21) |
| <i>Ruta del etileno</i> | (pag. 23) |
| <i>Interacciones entre las rutas del JA y del ET</i> | (pag. 27) |
| <i>Interacciones entre la ruta del SA y la del JA y del ET</i> | (pag. 27) |
| • Participación de otras hormonas en los mecanismos de defensa | (pag. 29) |
| • Las respuestas defensivas de las plantas: genes PR | (pag. 33) |
| • Las respuestas defensivas de las plantas: las fitoalexinas | (pag. 37) |
| • Defensas inducibles según el tipo de patógeno | (pag. 39) |
| • Mecanismos de defensa contra <i>Botrytis cinerea</i> | (pag. 41) |
| • Respuestas sistémicas inducidas | (pag. 45) |
| <i>Resistencia sistémica adquirida (SAR)</i> | (pag. 45) |
| <i>Resistencia sistémica inducida (ISR)</i> | (pag. 46) |
| <i>Resistencia inducida por herida (WIR)</i> | (pag. 47) |
| <i>Factores que influyen en la resistencia inducida</i> | (pag. 50) |
| ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE FITOPATOLOGÍAS FÚNGICAS | (pag. 51) |
| Historia del control químico de <i>Botrytis cinerea</i> | (pag. 51) |
| Biotecnología aplicada a cultivos | (pag. 55) |
| Control biológico | (pag. 56) |
| IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL SISTEMA TOMATE-BOTRYTIS CINEREA | (pag. 57) |

OBJETIVOS

(pag. 59)

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--|-----------|
| Material biológico | (pag. 61) |
| • Genotipos | (pag. 61) |
| • Cultivo de plantas | (pag. 62) |
| • Obtención de frutos | (pag. 62) |
| • Patógeno | (pag. 63) |
| <i>Obtención de esporas de B. cinerea</i> | (pag. 63) |
| Ensayos in vitro | (pag. 64) |
| • Efecto de distintos tratamientos sobre la germinación de esporas de B. cinerea. | (pag. 64) |
| <i>Diseño de los ensayos</i> | (pag. 64) |
| <i>Determinación del porcentaje de germinación. Mínima concentración inhibitoria (MCI)</i> | (pag. 65) |
| <i>Determinación de la eficacia del tratamiento a los 7 días</i> | |
| <i>Determinación del peso seco del micelio</i> | (pag. 65) |
| <i>Determinación de la reversibilidad del tratamiento sobre la germinación. Mínima concentración fungicida (MCF)</i> | (pag. 65) |
| <i>Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento del micelio.</i> | (pag. 66) |
| <i>Determinación de la actividad lítica del ácido hexanoico y del AAME</i> | (pag. 66) |
| <i>Determinación del efecto del AAME y del ácido hexanoico sobre la permeabilidad de la membrana de B. cinerea</i> | (pag. 67) |
| <i>-Medida del eflujo de fosfato al medio extracelular</i> | (pag. 67) |
| <i>-Test de exclusión de la eosina (EET)</i> | (pag. 67) |
| Infecciones con Botrytis cinerea | |
| • Infección en planta entera | (pag. 68) |
| • Infección en hoja aislada | (pag. 68) |
| • Infección de plantas de tomate cv. MicroTom | (pag. 69) |
| • Infección en frutos de tomate | (pag. 69) |
| <i>Infección por herida</i> | (pag. 69) |
| <i>Infección por spray</i> | (pag. 70) |
| Ensayos sobre soporte biológico | (pag. 70) |
| • Ensayo sobre fruto de tomate | (pag. 70) |
| • Ensayo sobre hoja cortada | (pag. 70) |
| Tratamientos con inductores | (pag. 71) |
| Tratamientos preventivos y curativos | (pag. 71) |

| | |
|--|-----------|
| • Tratamientos preventivos | (pag. 71) |
| <i>Tratamiento preventivo de plantas de tomate Ailsa Craig</i> | (pag. 71) |
| <i>Tratamiento preventivo de plantas de tomate cv. MicroTom</i> | (pag. 72) |
| <i>Tratamiento preventivo de frutos de tomate</i> | (pag. 72) |
| • Tratamientos curativos | (pag. 72) |
| <i>Tratamiento curativo de plantas de tomate Ailsa Craig</i> | (pag. 72) |
| <i>Tratamiento curativo de plantas de tomate cv. MicroTom</i> | (pag. 73) |
| <i>Tratamiento curativo de frutos de tomate</i> | (pag. 73) |
| Evaluación de los síntomas de la infección | (pag. 73) |
| Inmunodetección de la EGasa Cel1 | (pag. 74) |
| • Extracción de proteínas | (pag. 74) |
| • Western blot | (pag. 74) |
| Cuantificación de la deposición de calosa | (pag. 75) |
| Tratamiento con DDG | (pag. 75) |
| Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR en tiempo real | (pag. 76) |
| Tratamiento estadístico de los resultados | (pag. 77) |

CAPITULO I

Implicación de las β -1,4-endoglucanasas Cel1 y Cel2 en la interacción de *Solanum lycopersicum* con *Botrytis cinerea*

INTRODUCCIÓN

| | |
|---|-----------|
| Papel de la pared celular en la defensa frente a patógenos | (pag. 79) |
| Señales procedentes de la pared celular | (pag. 80) |
| Participación de enzimas hidrolíticas de la pared celular en la interacción planta-patógeno | (pag. 81) |
| Participación de enzimas de pared celular en la interacción planta- <i>Botrytis cinerea</i> | (pag. 82) |
| Las β -1,4 endoglucanasas | (pag. 84) |

RESULTADOS

| | |
|---|-----------|
| Acumulación de la proteína Cel1 en <i>Solanum lycopersicum</i> | (pag. 86) |
| Puesta a punto de la infección con <i>B. cinerea</i> en plantas de tomate | (pag. 87) |
| Estudios de infección con <i>B. cinerea</i> en plantas transgénicas antisentido | (pag. 88) |
| Estudio de la deposición de calosa | (pag. 90) |

| | |
|--|------------|
| Estudio de genes marcadores de las principales rutas de respuesta a patógenos en <i>Solanum lycopersicum</i> | (pag. 94) |
| Implicación de Cel1 y Cel2 en la interacción del fruto de tomate con <i>B. cinerea</i> | |
| • Estudios con frutos procedentes de plantas transgénicas | (pag. 95) |
| • Estudios con mutantes de maduración | (pag. 99) |
| • Estudios de infección con frutos Pearson y Nr | (pag. 102) |
| • Estudios de infección con los frutos Ailsa Craig, rin y rin-Cel2 | (pag. 103) |

DISCUSIÓN

| | |
|---|------------|
| Implicación de Cel1 y Cel2 en la interacción de la planta de tomate con <i>B. cinerea</i> | (pag. 105) |
| Interferencia de Cel1 y Cel2 en mecanismos de respuesta de la planta de tomate frente a <i>B. cinerea</i> | (pag. 107) |
| Implicación de Cel1 y Cel2 en la interacción del fruto de tomate con <i>B. cinera</i> | (pag. 108) |
| Perspectivas futuras derivadas de la implicación de Cel1 y Cel2 en la interacción tomate- <i>B. cinerea</i> | (pag. 111) |

CAPITULO II

Búsqueda de compuestos antifúngicos de baja toxicidad y de inductores de las defensas naturales de las plantas en el sistema tomate-*Botrytis*

INTRODUCCIÓN

| | |
|---|------------|
| Estrategias alternativas para el control de <i>Botrytis cinerea</i> | (pag. 115) |
| Uso de compuestos antifúngicos de baja toxicidad | (pag. 115) |
| Inducción de las respuestas de las plantas | (pag. 119) |
| Inductores | (pag. 119) |
| • Análogos del ácido salicílico | (pag. 120) |
| • Análogos del ácido jasmónico | (pag. 120) |
| • El etileno | (pag. 121) |
| • Vitaminas | (pag. 121) |
| • Sales de fosfato | (pag. 122) |
| • Probenazol | (pag. 123) |
| • El ácido β -aminobutírico (BABA) | (pag. 123) |

| | |
|--|------------|
| • El concepto de Priming | (pag. 124) |
| Compuestos que presentan efecto inductor y fungicida | (pag. 125) |
| • El quitosano | (pag. 125) |
| • Componentes lipofílicos de los aceites esenciales | (pag. 126) |
| • Compuestos volátiles emitidos por las plantas | (pag. 126) |
| Antecedentes y objetivos de este estudio | (pag. 129) |

RESULTADOS

Caracterización de la acción fungicida del monoéster etílico del ácido adípico (AAME)

- Estudio del efecto sobre la germinación de esporas de *Botrytis cinerea*. Influencia del pH. (pag. 130)
- Estudio del efecto del AAME sobre el crecimiento del micelio (pag. 132)
- Efecto sobre la integridad de las membranas de *B. cinerea* (pag. 133)
- Efecto sobre la permeabilidad de las membranas del hongo (pag. 134)
- Inoculación de frutos de tomate con esporas tratadas con AAME (pag. 135)

Estudio de la capacidad protectora del ácido hexanoico frente a la infección por *Botrytis cinerea* en plantas de tomate

- Tratamiento de plantas de tomate con ácido hexanoico (pag. 137)
- Caracterización del efecto inductor del ácido hexanoico. (pag. 139)

Comparación de la eficacia protectora del ácido hexanoico con la de otros inductores (pag. 139)

Estudio del mecanismo de acción del ácido hexanoico como inductor (pag. 140)

- Efecto del ácido hexanoico sobre la acumulación de calosa (pag. 140)
- Efecto del ácido hexanoico sobre las rutas de señalización hormonal que participan en la resistencia a patógenos (pag. 142)
- Implicación de la ruta mediada por el ácido abscísico en la resistencia inducida por el ácido hexanoico (pag. 145)
- Caracterización de la actividad antifúngica del ácido hexanoico (pag. 146)

*Estudio del efecto del ácido hexanoico sobre la germinación de esporas de *B. cinerea* a distintos pHs* (pag. 146)

Estudio del efecto sobre el crecimiento del micelio (pag. 148)

*Efecto sobre la integridad de las membranas de *Botrytis cinerea** (pag. 149)

*Efecto sobre la permeabilidad de la membrana celular de *B. cinerea** (pag. 150)

Comparación de la eficacia como fungicida del ácido hexanoico con fungicidas comerciales (pag. 151)

| | |
|---|------------|
| <i>Eficacia del efecto inhibitorio del ácido hexanoico sobre la germinación de esporas de B. cinerea inoculadas en un soporte biológico</i> | (pag. 154) |
| - Inoculación de esporas tratadas con ácido hexanoico en hojas de tomate | (pag. 154) |
| - Inoculación de esporas tratadas con ácido hexanoico en frutos de tomate | (pag. 155) |
| Aplicación del ácido hexanoico en plantas de tomate | (pag. 157) |
| • Tratamientos preventivos | (pag. 157) |
| <i>Ensayos en plantas de tomate del cultivar Ailsa Craig</i> | (pag. 157) |
| <i>Ensayos en plantas de tomate del cultivar MicroTom</i> | (pag. 158) |
| • Tratamientos curativos | (pag. 159) |
| <i>Ensayos en plantas de tomate del cultivar Ailsa Craig</i> | (pag. 159) |
| <i>Ensayos en plantas de tomate del cultivar MicroTom</i> | (pag. 160) |
| Aplicación postcosecha del ácido hexanoico | (pag. 162) |
| • Tratamientos preventivos | (pag. 162) |
| • Tratamientos curativos | (pag. 163) |
| | |
| DISCUSIÓN | |
| Caracterización del efecto fungicida del AAME | (pag. 165) |
| Efecto protector del ácido hexanoico. Caracterización de su actividad inductora | (pag 167) |
| Actividad antifúngica del ácido hexanoico | (pag 173) |
| El ácido hexanoico como tratamiento preventivo y curativo en tomate | (pag. 178) |

| | |
|---------------------|-----------|
| CONCLUSIONES | (pag.180) |
|---------------------|-----------|

| | |
|---------------------|-----------|
| BIBLIOGRAFÍA | (pag.182) |
|---------------------|-----------|

INTRODUCCIÓN GENERAL

LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Las plantas pueden ser atacadas por una amplia variedad de fitopatógenos microbianos (bacterias, virus y hongos), invertebrados (insectos herbívoros) e incluso por otras plantas. Sin embargo, a pesar de que las plantas carecen de movilidad para alejarse del peligro y de un sistema inmunitario especializado, la enfermedad es una excepción más que la norma en el mundo vegetal. Además, en muchos casos el desarrollo con éxito de una infección no provoca la muerte de la planta. Podría decirse que la selección natural actúa evitando la excesiva toxicidad del patógeno, que conduciría a una baja tasa de crecimiento o de producción de frutos (Thomma y col., 2001; Staskawicz y col., 2001; Cohn y col., 2001). Esta resistencia a patógenos se debe a que las plantas han desarrollado mecanismos defensivos eficientes.

En el caso de que todos estos mecanismos fallen y se produzca la infección, se considera que la interacción planta-patógeno es compatible, la planta es susceptible y el patógeno se define como virulento. Inversamente, cuando el patógeno no consigue invadir la planta la interacción planta-patógeno es incompatible, la planta es resistente y el patógeno se define como avirulento.

También se da el caso de interacciones compatibles en las cuales la planta no presenta síntomas de la enfermedad, a pesar de existir una infección real de los tejidos. A este fenómeno se le denomina tolerancia y es debido a que la planta, de alguna manera, es capaz de restringir los procesos bioquímicos que se requieren para el desarrollo de los síntomas. Las plantas tolerantes a la enfermedad, normalmente, actúan como reservorio del inóculo patogénico.

Los patógenos de plantas

Un fitopatógeno es un organismo que para completar todo o parte de su ciclo vital crece dentro de la planta, causándole un efecto negativo o estrés biótico. Cada patógeno ha desarrollado un sistema específico para invadir las plantas. Algunas especies penetran directamente la epidermis utilizando presión mecánica o bien, liberando enzimas líticas. Otros aprovechan entradas naturales (estomas, lenticelos, etc.) para introducirse. Por último, un tercer grupo de patógenos, denominados de herida, invade sólo tejidos que hayan sido previamente cortados o heridos (Agrios, 1988).

Al proceso de infección, colonización y reproducción del patógeno se le denomina patogénesis. Una vez dentro de la planta los patógenos emplean tres estrategias fundamentales de nutrición y crecimiento: biotrofia, necrotrofia o hemibiotrofia.

Los patógenos considerados biótrofos, causantes del enmohecimiento y de las oxidaciones en las plantas, han desarrollado estructuras especiales de alimentación (haustorios) que utilizan para extraer los nutrientes de las células vegetales, mientras las células permanecen vivas y en la mayoría de los casos, el patógeno elude el reconocimiento del huésped mediante la producción de supresores de las respuestas defensivas. Los necrótrofos, por su parte, secretan fitotoxinas o enzimas que matan las células vegetales en las primeras fases de la infección y se alimentan de los nutrientes del tejido necrosado (MacKinnon y col., 1999; Colmenares y col., 2002a y b).

La mayoría de los patógenos son claros biótrofos o necrótrofos. Ejemplos de biotrofia son las bacterias del género *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, los hongos del género *Peronospora* y *Erysiphe* y todos los virus vegetales, que precisan del metabolismo vegetal para su reproducción. El oomiceto *Peronospora parasitica* es tal vez el ejemplo más claro de patógeno biótrofo de *Arabidopsis thaliana*. Las infecciones compatibles comienzan con la germinación de las esporas sobre la superficie de la hoja, formándose un apresorio que facilitará la penetración de la hifa y la posterior formación del haustorio entre estas mismas células. El hongo crece y se extiende por toda la hoja, penetrando en las células del mesófilo y formando más haustorios. Durante todo este proceso la planta continúa viva (Koch, 1990). Por otro lado, ejemplos claros de necrotrofia son las bacterias del género *Erwinia* y los hongos de los géneros *Pythium*, *Alternaria* y *Botrytis*, este último objeto de estudio en esta tesis.

Sin embargo, muchos otros patógenos se comportan como biótrofos y necrótrofos, dependiendo del momento del ciclo vital o de las condiciones en las que se encuentren. A este tipo de patógenos se les llama hemibiótrofos. Muchos hongos que son comúnmente considerados necrótrofos podrían ser en realidad hemibiótrofos, en tanto que en las primeras fases de la infección siguen una estrategia biótrofa. También la bacteria *Pseudomonas syringae*, considerada generalmente como un biótrofo, ocasionalmente se comporta como un necrótrofo (Butt, 1998), por lo que probablemente debería ser tratada como un hemibiótrofo (Thaler y col., 2004). La bacteria penetra en la planta a través de heridas o de estomas y se multiplica en los espacios intercelulares. En las primeras fases de las infecciones compatibles no produce la muerte celular, pero en las últimas fases de la infección se producen clorosis y necrosis en la planta.

***Botrytis cinerea*: un modelo de necrotrofia**

Botrytis cinerea es, con mucho, la más importante de las 22 especies de *Botrytis* sensu estricto (Hennebert, 1975). Es un importante patógeno de plantas, muy común en la naturaleza, con un amplio espectro de especies hospedadoras (Elad & Evensen, 1995; Elad y col., 1995).

Los hongos de la familia *Sclerotiniaceae* fueron los primeros patógenos de plantas estudiados. De hecho, el género *Botrytis* fue establecido en 1729. En 1886 Antón de Bary describió la habilidad de necrosar y matar el tejido de la planta de *S. sclerotiorum*, un hongo estrechamente relacionado filogenéticamente con *B. cinerea* y que produce la podredumbre blanca (De Bary, 1886). William Brown realizó experimentos similares con el hongo causante de la podredumbre gris, *B. cinerea*, en la primera mitad del siglo XX (Brown, 1965). Tuvieron que pasar décadas hasta poder conocer, a nivel molecular, los factores clave involucrados en el proceso de infección. En la figura I.1 se esquematiza el proceso de infección de *B. cinerea*.

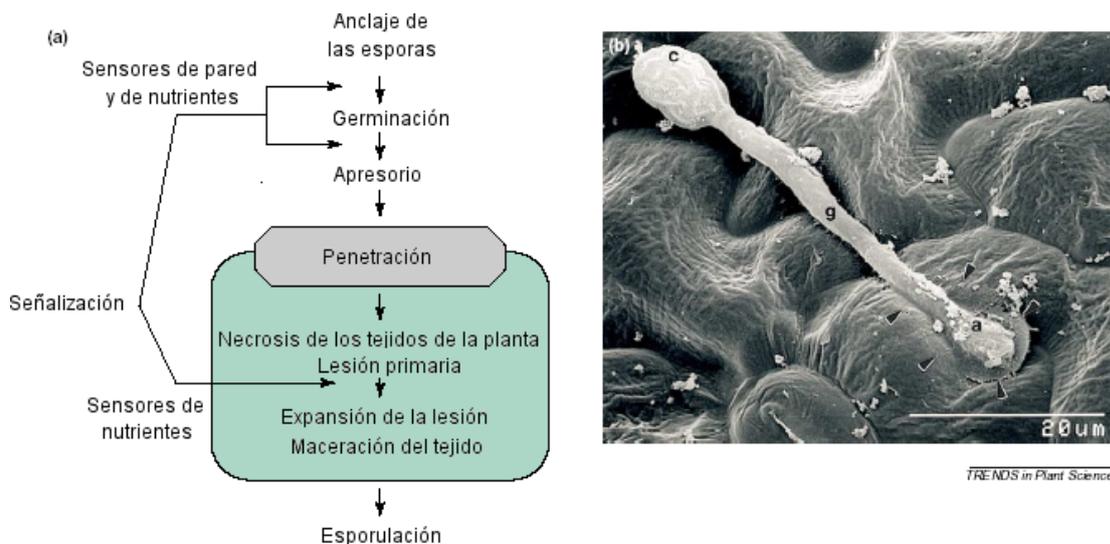


Figura I.1. Esquema del ciclo biológico de *Botrytis cinerea*. Figura I.1.a: esquema de los diferentes procesos fisiológicos de desarrollo que tienen lugar en la infección de plantas por *B. cinerea*. Figura I.1.b: Desarrollo de un apresorio de *B. cinerea* sobre la superficie de una hoja de tomate. (a) apresorio. (c) espora. (g) tubogerminativo. Figura adaptada de van Kan, 2006.

Las esporas, una vez sobre la hoja, deben penetrar la superficie foliar cuyas capas más superficiales están compuestas de cutina recubierta de cera. Para ello las esporas germinan y desarrollan el apresorio, que es una estructura que se diferencia cuando el patógeno se halla sobre la superficie del tejido vegetal, para formar una especie de estaca, pie o gancho penetrador, que raja la cutícula (Figura

I.1b). El mecanismo de penetración del apresorio en otros hongos necrótrofos, como *Magnaporthe grisea*, el causante de la piricularia, es ejercer una presión física sobre el tejido hospedante. Esa presión se ejerce gracias a la elevada turgencia osmótica generada en el apresorio, como consecuencia de la acumulación de glicerol (De Jong y col., 1997). Este mecanismo probablemente no sea el utilizado por *B. cinerea*, ya que no existe un septo o membrana que separe el apresorio del tubo germinativo. Aunque las esporas germinadas de *B. cinerea* contienen melanina (Doss y col., 2003), no secreta tanta como para crear la suficiente presión osmótica, como ocurre en *M. grisea*. A pesar de todo, la estructura que genera *B. cinerea* sobre la superficie foliar se sigue considerando un apresorio, porque la penetración requiere una proteína asociada a la membrana, BcPLS1 (Gourgues y col., 2004), que es homóloga de una proteína esencial para la penetración en *M. grisea* (Clergeot y col., 2001). Probablemente el apresorio de *B. cinerea* secrete enzimas que degraden la pared de la superficie foliar, es decir, cutinasas y lipasas. La secuencia del genoma de *B. cinerea* parece contener, al menos, seis cutinasas y una docena de lipasas (Tudzynski & Siewers, 2004; Viaud y col., 2005). No se sabe cuál es su papel en patogénesis, pero sí se ha visto que la punta del gancho penetrador genera peróxido de hidrógeno (Tenberge y col., 2002). Este peróxido podría inhibir la actividad normal de las oxidasas de la planta que modifican la cutícula para reforzarla, proporcionándoles un sustrato más fácil de descomponer. Una vez perforada la cutícula, el gancho crece en la pared anticlinal de la célula epidérmica subyacente. Esta pared es rica en pectina, por lo que esta fase de invasión necesita la acción de pectinasas y de las pectin metil esterases (PMEs). También están implicadas otras enzimas hidrolíticas de pared, como las celulasas y las hemicelulasas, cuyo papel se describirá con más detalle en el siguiente capítulo.

Una vez en la planta *B. cinerea* posee múltiples herramientas para facilitar la muerte celular del tejido vegetal:

- Metabolitos fitotóxicos
- Provocación del estallido respiratorio
- El ácido oxálico
- La toxina selectiva de hospedador NEP1

Entre los metabolitos fitotóxicos producidos por *B. cinerea* el mejor conocido es el botridial (Colmenares y col., 2002a). La delección de uno de los genes de su ruta biosintética provocó una severa reducción de la virulencia en una cepa de *B. cinerea* (Siewers y col., 2005), aunque no ocurrió igual con otros dos genes, indicando que ciertas cepas podrían depender estrictamente del botridial, mientras

que otras cepas podrían producir otras toxinas, como por ejemplo el botcinolides (Reino y col., 2004).

El estallido respiratorio se produce en muchas interacciones planta-patógeno durante la respuesta hipersensible que confiere resistencia frente a patógenos biótrosos (como se explica con detalle en apartados posteriores). Lógicamente, en el caso de un necrótrofo la muerte celular de la planta es beneficiosa (Govrin & Levine, 2000) y de hecho, *B. cinerea* inicia activamente un estallido respiratorio durante la penetración de la cutícula y la formación de la lesión primaria (Temberge y col., 2002). La infección de hojas de tomate conlleva una acumulación masiva de peróxido de hidrógeno, tanto en la membrana plasmática de las células vegetales, como en la vaina extracelular que cubre la superficie de la hifa (Schouten y col., 2002). Esto, además, conduce a la acumulación de radicales libres, culminando con la peroxidación lipídica y el agotamiento de antioxidantes (Muckenschnabel y col., 2002). Todos estos procesos oxidativos provocan un desequilibrio masivo del estado redox dentro y alrededor del tejido infectado, promoviendo así el avance de la enfermedad. Se ha identificado una superóxido dismutasa secretada por *B. cinerea*, *Bcsod1*, que se expresa en el frente de avance del apresorio desde el momento de la penetración de la cutícula. La delección de *Bcsod1* reduce la virulencia en muchos hospedadores (Rolke y col., 2004). La fuente de superóxido aún no ha sido identificada, pero podría ser producida por la propia planta (van Kan, 2006).

Por otra parte, el ácido oxálico es un ácido dicarboxílico beneficioso para hongos necrótrofos dada su capacidad acidificante, secuestrante e inhibidora del estallido respiratorio. En el primer caso, facilitaría la actividad de las enzimas degradativas implicadas en el proceso de infección, pectinasas, proteinasas y lacasas, que son activas a pH ácido (Manteau y col., 2003). En el segundo caso, porque el oxalato es capaz de quelar los iones calcio embebidos en la estructura de las pectinas, sobre todo cuando éstas están parcialmente degradadas por las pectinasas. Al secuestrar el calcio se abre la estructura tipo "caja de huevos" de la pectina y se facilita su degradación. Por último, el oxalato puede estimular el estallido respiratorio y la muerte celular programada (Kim y col., 2008). Se han generado mutantes deficientes en oxalato de *Sclerotinia sclerotiorum* que son avirulentos, pero que revertiendo la mutación y restableciendo la producción de oxalato, vuelven a ser patógenos compatibles (Godoy y col., 1990). Al igual que *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* es un notorio productor de ácido oxálico (Germeier y col., 1994), aunque todavía se están buscando los genes involucrados en su ruta de síntesis.

Se ha aceptado, generalmente, que los patógenos biótrosos necesitan de una intrincada interacción con la planta hospedadora, presumiblemente como resultado

de una evolución conjunta (de Meaux & Mitchell-Olds, 2003). También se ha considerado que los hongos necrótrofos no tienen una verdadera interacción con la planta hospedadora, limitándose a matar las células del tejido vegetal y a absorber nutrientes. Sin embargo, actualmente se considera que la infección de *B. cinerea* requiere la participación activa del hospedador, en concreto, de la activación de la muerte celular programada. Por otra parte, la percepción y la señalización juegan un papel importante en todas las fases de la infección de *B. cinerea*. La germinación de las esporas tiene lugar sobre un soporte biológico. Para que germine en un medio hidrofílico se necesitan nutrientes (Doehlemann y col., 2005). El proceso de germinación también se ve influenciado por la firmeza de la pared vegetal (Doehlemann y col., 2006), indicando que efectivamente *B. cinerea* percibe las propiedades físico-químicas del medio durante la germinación. También existen evidencias que indican que la virulencia de *B. cinerea* depende de la señalización mediada por una proteína G. El genoma de *B. cinerea* contiene 3 genes que codifican proteínas G y la delección de uno de ellos redujo severamente su virulencia (Gronover, 2001).

Los mecanismos de defensa inducibles de las plantas

Para protegerse de los ataques por patógenos las plantas han desarrollado defensas constitutivas e inducibles. Entre las defensas constitutivas se incluyen tanto las barreras físicas, como la producción de metabolitos secundarios (fitoanticipinas) y de proteínas antimicrobianas. Todos estos obstáculos para la entrada y el progreso del patógeno dentro de la planta constituyen lo que se ha dado en llamar resistencia inespecífica (Thordal-Christensen, 2003). Estas barreras pueden ser salvadas por el patógeno y así ser capaz de invadir la planta. Una vez se ha establecido el contacto con la misma, el patógeno produce y secreta elicitores que activan las defensas inducibles dirigidas, en última instancia, a la contención del patógeno. Entre éstas destacan la rápida muerte celular programada o respuesta hipersensible (HR), el reforzamiento de la pared celular (a través de la producción de calosa y lignina), la producción de fitoalexinas y la síntesis de proteínas relacionadas con la resistencia a patógenos (proteínas PR).

Los mecanismos inducibles conllevan, pues, la percepción específica del ataque del patógeno y conducen, a veces, al establecimiento en la planta de un estado de resistencia de amplio espectro que la protege de subsiguientes infecciones y que recibe el nombre de Resistencia sistémica adquirida o Systemic acquired resistance (SAR).

El reconocimiento del patógeno

Algunos mecanismos de reconocimiento conforman un modelo conceptualmente simple en el que un receptor de la planta interacciona directamente con una molécula del patógeno. Este modelo incluye la interacción entre efectores de los patógenos y las proteínas de resistencia (proteínas R) de la planta, pero también la interacción entre los denominados MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*) y los receptores de MAMPs (Nurenberger & Brunner, 2002). Otros mecanismos de reconocimiento son indirectos. Éstos conforman el denominado modelo del guardián, en el que las proteínas R reconocen indirectamente los efectores derivados del patógeno, a través de las perturbaciones que esos efectores causan en la planta. En cualquier caso, la respuesta de la planta comienza por el reconocimiento del patógeno al iniciar la infección, a menudo, según el modelo gen a gen (Flor, 1971). Esto supone una habilidad crucial para la supervivencia de la planta y por ello se describe este modelo en primer lugar.

Genes R. Modelo gen a gen

Harold H. Flor describió en 1971 el primer modelo genético de resistencia vegetal a patógenos, según el cual la resistencia sólo se produce cuando existe un reconocimiento entre el producto de un gen dominante (R) de la planta y el producto de un gen dominante complementario denominado de avirulencia (Avr) que expresa el patógeno (Glazebrook, 2001). El reconocimiento de los factores Avr por parte del producto de los genes R provoca la inducción de una respuesta defensiva rápida, que normalmente va acompañada de un estallido respiratorio y de la respuesta hipersensible (HR), una muerte celular programada que restringe en última instancia la invasión (Abramovitch & Martin, 2004; Nurnberger & Brunner, 2002).

Se han identificado muchos genes R, pertenecientes tanto a monocotiledóneas como a dicotiledóneas y se han encontrado cientos de homólogos en diversas especies. Todos ellos presentan estructuras conservadas y confieren resistencia a un amplio rango de patógenos (Ellis y col., 2000; Michelmore, 2000; Bent, 1996; Jones, 1996; Martin y col., 2003; Hammond-Kosack & Parker, 2003; Jones & Takemoto, 2004; Takken, 2000). Las proteínas que codifican los genes R se agrupan en 5 clases, ilustradas en la figura I.2.

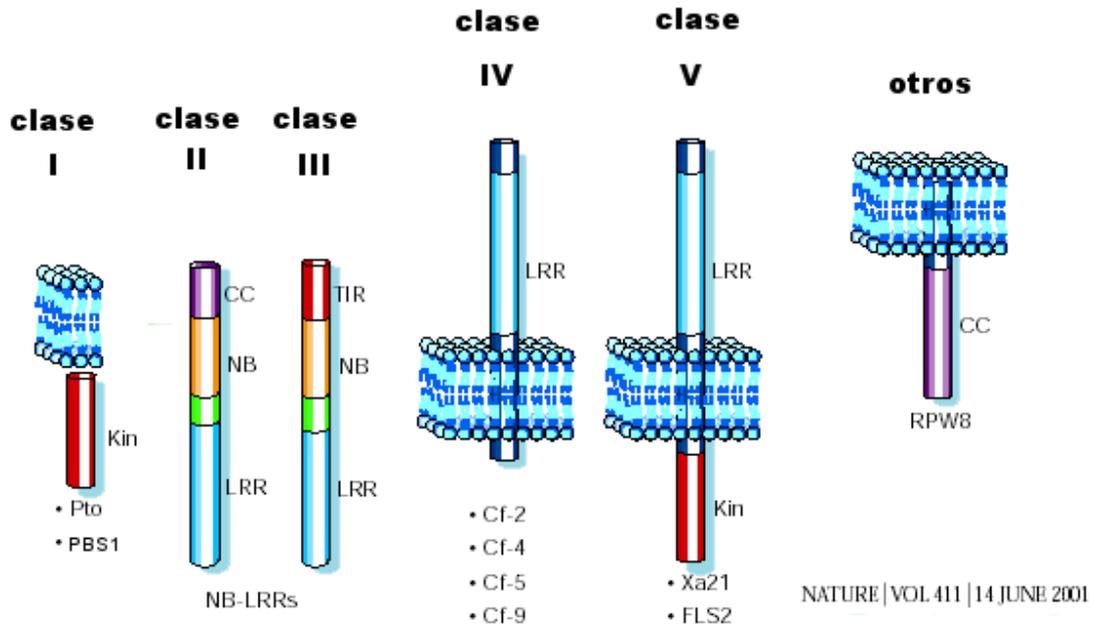


Figura I.2. Clases de genes R y su estructura. Figura adaptada de Dangl & Jones, 2001.

Un carácter muy común entre las proteínas R es un motivo repetitivo rico en leucina (LRR). Con la secuencia consenso xxLxLxx esta región es muy variable, de manera que parece haber evolucionado para ser capaz de detectar variaciones en los factores de avirulencia de los patógenos, aunque también puede interactuar con factores de la planta huésped, funcionando así como efector (Jones, 1996; Ellis y col., 2000; Dodds y col., 2001; Martin y col., 2003; Jones & Takemoto, 2004). La mayoría de proteínas R con este motivo poseen, además, un sitio de unión a nucleótidos (NBS) central, que podría permitir unir ATP o GTP y de esta manera, activar las defensas. Otros modelos conciben los NBS como regiones adaptadoras que favorecerían la unión del dominio de reconocimiento carboxi-terminal LRR con el dominio amino-terminal de los efectores (Jones, 1996; Martin y col., 2003).

El gen *Pto* de tomate constituía hasta hace poco tiempo el único miembro de los genes R de clase I. Codifica una serín/treonín quinasa de tomate, que se asocia a la membrana a través de un sitio de miristoilación. Diversos estudios parecen indicar que la transducción de la señal patogénica podría realizarse a través de la autofosforilación del gen *Pto* o por la fosforilación de diversos activadores transcripcionales (Martin y col., 2003). El otro miembro de este grupo de genes R es *PBS1* de *Arabidopsis* (Swiderski & Innes, 2001).

Además de estas proteínas R, que son de localización citoplasmática, se han encontrado otras en las que el dominio LRR es extracelular y que en lugar de la región NBS poseen un dominio transmembrana. La mayoría de ellas poseen una pequeña cola citoplasmática a la cual no se le ha asignado función alguna, excepto

en el caso del gen *Xa21* de arroz, que confiere resistencia a la bacteria *Xanthomonas orizae*. Su cola citoplasmática posee función serín/treonín quinasa similar a la del gen *Pto* de tomate (Martin y col., 2003). En tomate, los genes *Cf* codifican receptores asociados a la membrana que reconocen factores de avirulencia de *Cladosporium fulvum* activando la formación de ROS (especies reactivas de oxígeno), cambios en los flujos iónicos, la activación de las cascadas de quinasas, la HR, cambios en la expresión de genes y posiblemente, la degradación de la proteína reconocida. Las proteínas *Cf* comprenden, predominantemente, dominios LRRs extracelulares y carecen de un dominio de señalización, lo que sugiere que la activación de las respuestas defensivas está mediada por la interacción con otras proteínas (Rivas & Thomas, 2005).

Existen unas pocas proteínas R que no se pueden clasificar dentro de los 5 grupos por poseer estructuras y funciones muy divergentes (Martin y col., 2003). Algunos ejemplos son el gen *RRS1* de *Arabidopsis*, que además de percibir la señal elicitora, podría unirse al DNA para conferir directamente el fenotipo de resistencia (Deslandes y col., 2002) y los genes *Ve1* y *Ve2* de tomate, para los que se especula con que, tras el reconocimiento del factor de virulencia, la proteína R se localiza citoplasmáticamente, donde es rápidamente degradada (Kawchuk y col., 2001).

Algunos de los homólogos de los genes R están implicados en funciones de desarrollo, como el gen *SIRK* (*senescence-induced receptor-like kinase*) o el gen *SARK* (*senescence-associated receptor-like kinase*) que están implicados en la percepción y en la transducción de la señal que conduce a la senescencia en la planta (Hajouj y col., 2000; Robatzek & Somssich, 2002; Yoshida, 2003). Se ha sugerido que en algunas ocasiones la resistencia gen a gen puede ser ejecutada por proteínas similares a las R, que serían las encargadas de captar moléculas indispensables para el desarrollo del patógeno (Nürnbergger & Brunner, 2002; Asai y col., 2002; Hammonk-Kosack & Parker, 2003).

Casi ninguno de los genes R muestra una regulación transcripcional notable, como consecuencia de la infección patogénica. Probablemente ello sea debido a que en realidad codifican receptores constitutivos que son los que regulan la expresión de otros genes (Wan y col., 2002). No obstante, existen indicios de que la regulación de la expresión de los genes R puede ser más prominente a nivel post-transcripcional (Austin y col., 2002; Azevedo y col., 2002; Nishimura & Somerville, 2002).

En cuanto a los genes de avirulencia, se han aislado muchos genes *avr*, principalmente a partir de cepas de las bacterias del género *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (White y col., 2000; Martin y col., 2003). Todavía no se conoce mucho sobre los factores de avirulencia fúngicos y víricos (Ellis y col., 2000; Feys &

Parker, 2000; Wan y col., 2000). Numerosas evidencias indican que algunos factores de avirulencia podrían ser también efectores de virulencia (Martín y col., 2003). En el caso de las bacterias fitopatógenas muchos de los genes de avirulencia codifican efectores del tipo III y contribuyen a la virulencia en plantas hospedadoras que carecen del gen R complementario. Los genes R habrían evolucionado para reconocer estos factores de virulencia, con el fin de contener el desarrollo del patógeno (Hammond-kosack & Parker, 2003; Jones & takemoto 2004).

Sólo se ha podido demostrar la interacción directa entre las proteínas R y Avr para tres parejas R-Avr. Una de ellas es la proteína quinasa de tomate (Pto) que reconoce la proteína efectora AvrPto de la bacteria biótrofa *P. syringae* pv. *Tomato*, tanto *in vitro* (Tang y col., 1996; Scofield y col., 1996; Kim y col., 2002) como *in vivo* (Shan y col., 2000; Chang y col., 2001). Así, las plantas portadoras de mutaciones en estas proteínas, que impiden su interacción física, son incapaces de activar la respuesta defensiva.

Diversos estudios han revelado que, en algunas ocasiones, las proteínas R forman parte de complejos multiproteicos en ausencia de patógenos. Se especula que el ensamblaje de estos complejos ha de ser regulado por chaperonas (Muskett & Parker, 2003). Asimismo, se han detectado complejos *in vivo* que contienen una proteína R, una Avr y otra proteína adicional de la planta, indicando de nuevo que el sistema de reconocimiento es mucho más complejo de lo que se preveía en un principio (Leister & katagiri, 2000; Martin y col., 2003).

Hipótesis del guardián

Este modelo propone que las proteínas R no se unirían directamente al producto del gen de avirulencia, sino que detectarían las alteraciones causadas por él en las proteínas de la planta huésped (Van der Biezen & Jones, 1998). Por tanto, la función de las proteínas R sería hacer de centinelas de otras proteínas diana, a las cuales se unirían los factores de avirulencia, tal como se propone en los modelos utilizados en mamíferos (Jones & Dangl, 2006). Esto explicaría cómo es posible que las plantas reconozcan miles de patógenos diferentes utilizando tan solo unos cientos de genes R. El ejemplo mejor caracterizado que apoya esta hipótesis es la interacción *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae*. RPS2 y RPS5 son proteínas R que reconocen indirectamente los efectores AvrRpt2 y HopAR1. Éstos tienen como diana componentes importantes de la señalización defensiva, como son RIN4 y PBS1, cuya degradación promueve la virulencia del patógeno. RPS2 y RPS5 no interaccionan físicamente con los efectores bacterianos, sino que monitorizan la

integridad de RIN4 y PBS1. En el momento en que detectan su degradación, activan una respuesta defensiva que detiene el avance del patógeno (Mackey y col., 2003; Shao y col., 2003; Axtell & Staskawicz, 2003; Day y col., 2005; Ade y col., 2007). Por otra parte, la resistencia observada en las plantas de tomate que expresan el gen *Cf-2* frente a la cepa de *Cladosporium fulvum*, portadora del gen *avr2*, requiere la presencia de la proteasa Rcr3, de localización extracelular. Se especula con que Rcr3 está encargada del procesamiento de Avr-2, Cf-2 u otras proteínas vegetales, antes de que se produzca el reconocimiento (Kruger y col., 2002a).

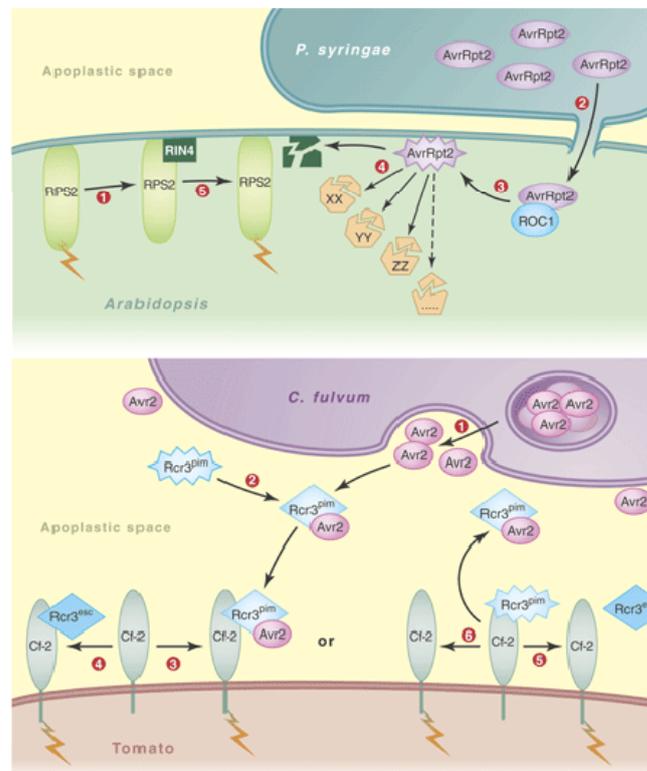


Figura 1.3. Modelo de reconocimiento de factores de avirulencia del patógeno en *Arabidopsis* (arriba) y en tomate (abajo). Figura de Schulze-Lefert & Bieri (2005)

Otro ejemplo lo constituye la proteína quinasa Pto de tomate que, para poder activar las respuestas defensivas derivadas del reconocimiento del factor de avirulencia *AvrPto*, necesita la presencia de la proteína Prf que contiene dominios NBS y LRR, semejantes a los de algunos productos de los genes R (Oldroyd & Staskawicz, 1998).

MAMPs

En la actualidad se considera que existen dos sistemas fundamentales de reconocimiento del patógeno. Por una parte, el sistema que se acaba de describir, basado en el reconocimiento de efectores patogénicos utilizando proteínas R y por otro lado, un sistema que utilizaría receptores con dominios transmembrana, que reconocerían una serie de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), lo que desencadenaría la respuesta defensiva. Dado que las moléculas que pueden actuar como PAMPs pueden encontrarse también en microorganismos no patógenos, recientemente se ha introducido el término MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns* o patrones moleculares asociados a microbios) (Mackey & McFall, 2006). Estos MAMPs son reconocidos por los denominados PRRs (*pattern recognition receptors*), cuya activación dispara la respuesta defensiva, tanto en el caso de la resistencia de tipo gen a gen, como en la resistencia basal (Jones & Dangl, 2006). La naturaleza de estos MAMPs es muy diversa, siendo habitualmente moléculas esenciales para la vida del microbio, aunque no jueguen necesariamente un papel en su patogenicidad. Algunos ejemplos de MAMPs son componentes estructurales de la pared celular y de la membrana de algunos hongos, como el ergosterol, la quitina y los β -glucanos. También lo son los lipopolisacáridos de las membranas celulares de las bacterias Gram-negativas (LPS), o la flagelina de los órganos de motilidad de las bacterias (Zipfel & Felix, 2005). En muchas ocasiones la zona de los MAMPs que reconocen los PRRs coincide con la zona más conservada de la proteína, como en el caso del fragmento de 22 aminoácidos de la flagelina, fls22 (Felix y col., 1999). Las modificaciones post-traduccionales también son importantes. La glicosilación de la flagelina es importante para su reconocimiento en tomate y en tabaco (Taguchi y col., 2003; Takeuchi y col., 2003). Las diferentes familias de plantas han desarrollado sistemas de reconocimiento para distintas moléculas de un mismo microbio. Este es el caso del factor de elongación EF-Tu o de las proteínas de choque por frío CSP. Ambos tipos de proteínas son abundantes en bacterias, pero la percepción de EF-Tu está restringida a brasicáceas, mientras que las CSPs son reconocidas por las solanáceas (Felix & Boller, 2003; Kunze y col., 2004).

Las respuestas que desencadena el reconocimiento mediado por MAMPs son muy rápidas e incluyen la activación de flujos iónicos a través de la membrana plasmática, la generación de ROS, NO y etileno, así como la deposición de calosa y de compuestos antimicrobianos (Zipfel & Felix, 2005). La señalización mediada por MAMPs utiliza, al menos, dos cascadas de MAP quinasas diferentes (Shen y col., 2007; Suarez-Rodriguez y col., 2007). Existen evidencias de que los MAMPs

producen cambios en la transcripción de grupos de genes con un grado de solapamiento muy elevado, probablemente utilizando señalizaciones convergentes (Desaki y col., 2006). Además, los MAMPs inducen genes importantes, tanto para la defensa no-huésped, como para la defensa basal, por lo que su reconocimiento parece un mecanismo muy importante para la defensa preventiva, así como para la defensa una vez que el patógeno ha invadido la planta (Zipfel y col., 2004; Lipka y col., 2005).

Recientemente se ha propuesto una nueva terminología que englobaría a todas las moléculas que permiten el reconocimiento del patógeno y que desencadenan la respuesta de la planta (Figura I.4., Mackey & McFall, 2006). Los autores acuñan el término MIMPs (*microbe-induced molecular patterns*) para las moléculas que son liberadas como consecuencia de la actividad de algún efector del patógeno y activan la respuesta defensiva en la planta.

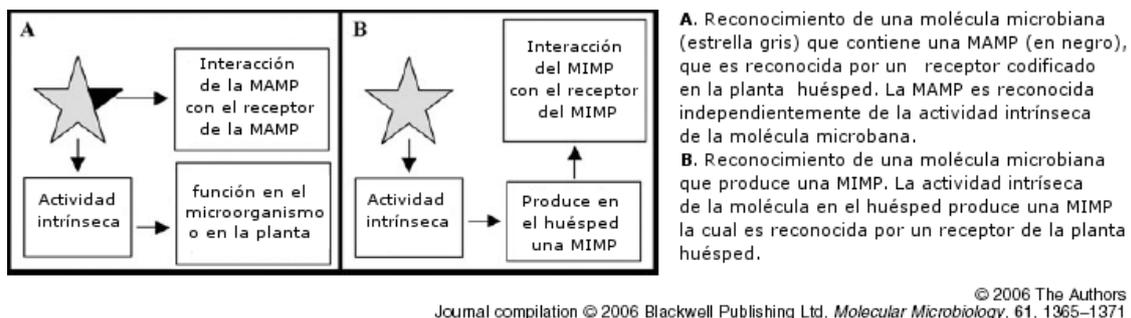
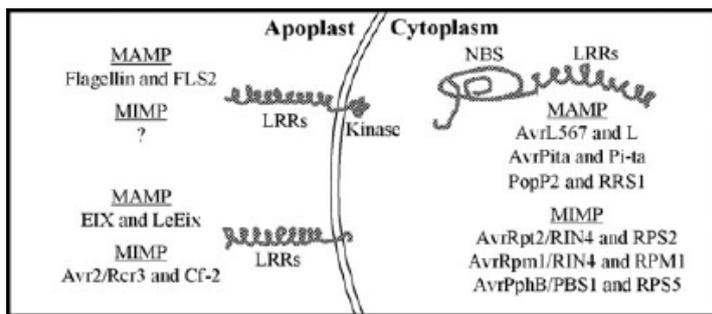


Figura I.4. Modelos esquematizados de reconocimiento de patógenos. Figura adaptada de Mackey & McFall, 2006.

Por tanto, el mecanismo de reconocimiento de las MIMPs se ajustaría a la hipótesis del guardián. Poniendo de nuevo como ejemplo la interacción entre el gen de resistencia *Cf-2* de tomate y el gen de avirulencia *avr2* de *C. fulvum*, que requiere la presencia de la proteasa Rcr3, Avr2 se une e inhibe la actividad proteasa de RCr3, independientemente de Cf-2 (Rooney y col., 2005). En este caso existirían varias alternativas. Una sería que Avr2 contuviese una MAMP, funcionando Rcr3 de co-receptor para Cf-2. Otra alternativa sería que Avr2 se uniese a Rcr3 provocándole un cambio de conformación, lo que haría que funcionase como una MIMP que reconocería Cf-2. *Necrotic (Ne)* es un alelo de *RCr3* de tomate que produce muerte celular dependiente de Cf-2 en ausencia de Avr2 (Kruger y col., 2002a). Este resultado apoyaría la hipótesis del guardián y que Cf-2 reconocería una MIMP generada por Avr2, en vez de una MAMP en Avr2.

Asimismo, los autores proponen que tanto los receptores de MAMPs como los receptores de MIMPs sean considerados subclases de proteínas R, puesto que no son diferentes en lo que respecta a su estructura proteica ni a las respuestas que inducen. En la figura I.5 se ilustran tres clases principales de proteínas R. De cada clase hay varios efectores que contienen y/o actuarían como MAMPs y sus receptores R correspondientes. También hay ejemplos de efectores que generarían MIMPs, la molécula MIMP generada y el receptor R de la planta que lo reconoce (figura I.5).



Las principales clases de proteínas R reconocen MAMPs y MIMPs. Las proteínas con estructura de receptor contienen dominios LRR. Algunas de estas tienen un dominio de quinasa intracelular. Las proteínas R citoplasmáticas tienen un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y LRRs. Junto a cada tipo de receptor, se muestra una lista de moléculas microbianas que contienen una MAMP o que producen una MIMP y su receptor en el huésped.

Figura I.5. Relación entre proteínas R y las MAMPs/MIMPs. Figura adaptada de Mackey & McFall, 2006.

Teoría del zigzag

La visión actual de la respuesta inmune de las plantas puede resumirse en cuatro fases, según el llamado modelo del *zigzag* (Figura I.6., Jones & Dangl, 2006). En la fase 1, los MAMPs son reconocidos por los PRRs, activándose la respuesta defensiva que impide la colonización del patógeno. Los patógenos que logran superar con éxito esta fase, despliegan efectores que contribuyen a la virulencia, interfiriendo con la resistencia mediada por el reconocimiento de los MAMPs (fase 2). En la fase 3 los efectores son reconocidos específicamente por las proteínas R, lo que desencadena la resistencia, generalmente a través de una respuesta hipersensible (HR), en el sitio de infección. Ese reconocimiento puede ser directo o indirecto (hipótesis del guardian). En la fase 4, gracias a la selección natural, los patógenos evolucionan y son capaces de suprimir este reconocimiento específico, bien a través de la eliminación del efector, o de su modificación, bien utilizando nuevos efectores capaces de interferir en el reconocimiento y/o posterior señalización defensiva (Figura I.6, en color azul). Esa selección también hace que aparezcan nuevas proteínas R, con nuevas especificidades, que activen de nuevo la respuesta defensiva (Jones & Dangl, 2006)

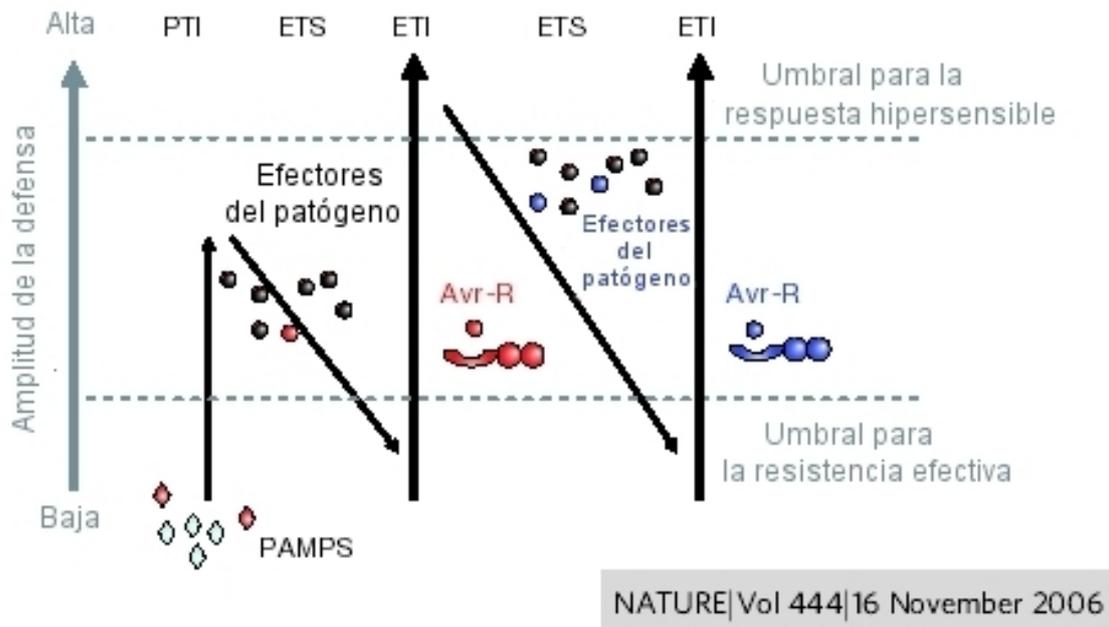


Figura 1.6. Esquema ilustrativo del modelo de Zig-Zag. Figura adaptada de Jones & Dangl, 2006. PTI: Inmunidad inducida por PAMPs o MAMPs. ETS: Susceptibilidad inducida por efectores. ETI: Inmunidad inducida por efectores mediada por genes R.

Respuestas tempranas tras el reconocimiento del patógeno

Después de reconocer al patógeno se producen una serie de cambios en las células vegetales que incluyen: flujos de calcio, alcalinización del espacio extracelular, activación de protein-quinasas, reprogramación transcripcional y la síntesis rápida y transitoria de una serie de moléculas, como las especies reactivas de oxígeno (ROS o ROI) y de nitrógeno (NO) (Kotchoni & Gachomo, 2006; Veronese y col., 2006). La rapidez e intensidad de la activación de esa cascada de reacciones es lo que marca el éxito de la resistencia. Muchos de los procesos que ocurren durante la respuesta gen a gen también tienen lugar en interacciones compatibles, pero con menor velocidad y reducida amplitud (Lamb & Dixon, 1992; Tao y col., 2003). Esta respuesta es denominada resistencia basal. Diferentes estudios han revelado que estos cambios son similares, independientemente del patógeno o efector utilizado (Felix y col., 1999; Jabs y col., 1997; Piedras y col., 1998).

El estallido respiratorio

Las ROS son producidas en el metabolismo normal de las células vegetales, principalmente en el cloroplasto durante la fotosíntesis (Asada, 1999; Mittler, 2002). Los niveles de ROS son finamente regulados por sistemas de detoxificación

enzimáticos o mediante la formación de complejos con vitaminas antioxidantes, proteínas o tioles (Kovtun y col., 2000; Scandalios, 1997). Son utilizadas como segundos mensajeros en las cascadas de transducción de la señal defensiva, así como en la activación de las proteín quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) para responder a varios estreses (Conrath y col., 2002; Kotchoni & Gachomo, 2006). Por otra parte, elevados niveles intracelulares de ROS pueden causar grandes daños y la muerte de la célula. De hecho, se ha demostrado que la rápida generación de peróxido de hidrógeno es uno de los primeros eventos observables en los procesos de penetración de muchos patógenos (Mellersh y col., 2002). Además, se ha detectado acumulación de ROS extracelular durante diferentes interacciones planta-patógeno (ThordalChristensen y col., 1997) y se ha demostrado un efecto antimicrobiano sobre varios patógenos (Bestwick y col., 1997; Kotchoni & Gachomo, 2006).

Las cascadas de fosforilación

Cada vez se considera más importante el papel de las MAPKs en la respuesta defensiva de las plantas y en la resistencia mediada por proteínas R o por MAMPs, dado que la percepción de diversos patógenos inicia una serie de señalizaciones que convergen en la activación de cascadas conservadas de MAPKs (Asai y col., 2002; Nakagami y col., 2005). Tras el reconocimiento del patógeno, generalmente, se produce un estallido respiratorio y la activación de estas rutas de MAPKs. Las MAPKs activadas (fosforiladas), son generalmente transportadas al núcleo, donde activan componentes de la señalización, como factores de transcripción que regulan la expresión de los genes de respuesta (Khokhlatchev y col., 1998). Se han descrito numerosos efectores capaces de desencadenar una respuesta defensiva dependiente de la activación de cascadas de MAP quinasas. En *Arabidopsis* se ha comprobado que bacterias, hongos y diferentes elicitors, inducen específicamente la actividad de AtMPK6, pero no la de AtMPK3 (Nuhse y col., 2000). Sin embargo, ambas forman parte de una cascada de señalización recientemente diseccionada, que es activada por el elicitor fls22 y que induce respuestas generales de defensa, pero no HR (Asai y col., 2002; Gomez-Gomez & Boller, 2000). La unión de la flagelina bacteriana al receptor FLS22 induce la activación de MAPKs, que a su vez activan factores de transcripción de la familia WRKY, estableciendo un vínculo directo entre los receptores de membrana y la señalización mediada por MAPKs (Asai y col., 2002). AtMPK4 también funciona como un regulador de la respuesta defensiva. Recientemente se ha identificado un sustrato de esta quinasa, MKS1, cuya sobreexpresión es suficiente para inducir genes de defensa regulados por

WRK25 y WRK33, haciendo a las plantas más resistentes (Ekengren y col., 2003). En tabaco la expresión transitoria de formas activas de las quinasas SIPK y las quinasasquinasas SIPK o NtMEK2, da lugar a la aparición de algunas respuestas como la HR o la inducción de genes relacionados con la defensa (Kim y col., 2003; Zang & Liu, 2001). Inversamente, la reducción de su expresión conlleva una atenuación de la resistencia al virus del mosaico del tabaco (TMV) (Jin y col., 2003; Sharma y col., 2003). En tomate se ha demostrado la activación transitoria de las quinasas NTF6 y WIPK en respuesta al reconocimiento de avrPtoB durante la infección por *P. syringae*. Además, la resistencia a esta bacteria se ve comprometida al silenciar las MAP-quinasaquinasas MEK1 y MEK2, indicando que todas ellas son reguladores clave en dicha interacción (Kovtun y col., 2000; Ekengren y col., 2003).

La respuesta hipersensible (HR)

Como se ha mencionado antes, hay dos respuestas defensivas que se consideran típicas de la resistencia gen a gen: el estallido respiratorio, ya comentado y la respuesta hipersensible (HR), que es un tipo de muerte celular programada, cuyo objetivo, probablemente, sea actuar contra los patógenos biótros, limitándoles el agua y los nutrientes. La HR también se produce en interacciones compatibles con necrótrofos, como es el caso de *B. cinerea*, que de hecho se aprovecha de esta respuesta para ampliar la zona de necrosis y continuar con el avance de la infección (Govrin & Levine, 2000). En realidad, no se sabe aún si la aparición de la HR está causada por el avance del patógeno o si es consecuencia de la acción de sustancias producidas por la propia planta para obstaculizar el avance del mismo. Además, existen casos de resistencia gen a gen que no implican HR, como es el caso de la resistencia de la cebada a *Erisiphe graminis* sp *hordei*, mediada por el gen R *Mlo* (Freialdenhoven y col., 1996; Knogge, 1996) o de la resistencia al virus X de la patata mediada por el gen *Rx* (Köhm y col., 1993).

La transducción de la respuesta mediante señalización hormonal

En la respuesta defensiva están involucradas varias fitohormonas que regulan distintas rutas de señalización. Estas hormonas tienen funciones clave en varios aspectos de la defensa de la planta, incluyendo la respuesta a estreses abióticos, como herida u ozono y la respuesta a insectos herbívoros y a microorganismos patógenos. Existen dos rutas principales de señalización bien caracterizadas. Una ruta es dependiente del ácido salicílico (SA) y la otra es dependiente del ácido jasmónico (JA) y del etileno (ET). Estas rutas no funcionan completamente

independientes, sino que interactúan en varios puntos, funcionando como una compleja red de señalización en la que, recientemente, se han visto implicadas otras fitohormonas como el ácido abscísico (ABA). En la figura I.7 se muestra un esquema clásico de las rutas de señalización hormonal de las plantas y las interrelaciones entre ellas.

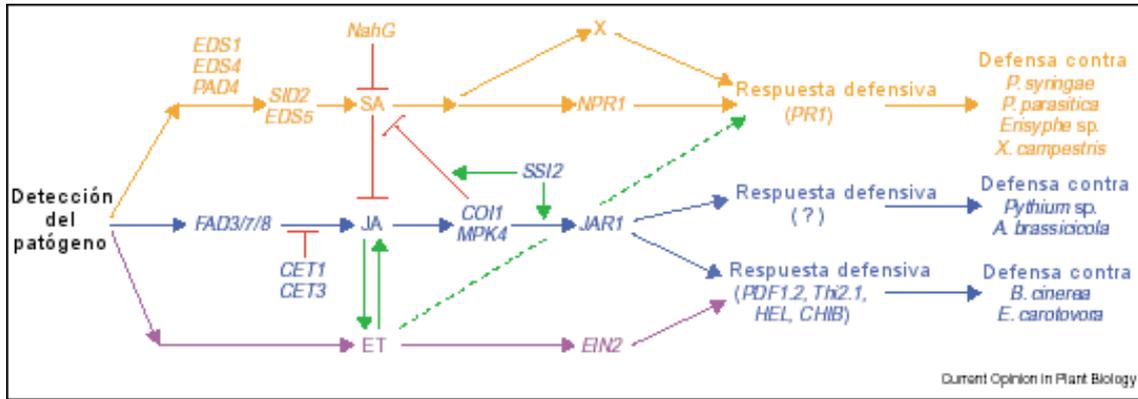


Figura I.7. Rutas de resistencia principales de las plantas y sus interacciones. Figura adaptada de Kunkel & Brooks, 2002.

Ruta del ácido salicílico

El SA es un compuesto fenólico simple que constituye una fitohormona muy común en las plantas y que interviene en multitud de procesos biológicos, como el crecimiento o la floración (Dempsey y col., 1999; Shah y col., 1999) además de jugar un papel crucial y muy extenso en las respuestas defensivas (Dempsey y col., 1999; Shah y col., 1999; Delaney y col., 1994). Tanto cuando se produce la HR, como tras el ataque de ciertos patógenos, se induce la activación de la ruta del salicílico (SA). Los niveles endógenos de SA aumentan en el tejido infectado y las aplicaciones exógenas de esta molécula incrementan la resistencia a muchos patógenos (Lawton y col., 1995). El ácido salicílico se acumula activando varios genes que son presuntamente efectores de la defensa, incluyendo *PR1*. Muchos de estos genes PR son utilizados como marcadores de esta ruta de señalización. Además, el SA es necesario para la rápida activación de las defensas mediadas por diferentes genes R, para la inducción de las defensas locales que contienen el avance de las infecciones por patógenos virulentos y para el establecimiento de la llamada resistencia sistémica adquirida (SAR), que se describirá más adelante.

Los mutantes que presentan deficiencias en los niveles de síntesis de SA o en la percepción de esta molécula señalizadora tras una interacción patogénica, presentan susceptibilidad a diferentes tipos de patógenos. A continuación se

describen algunos ejemplos de estos mutantes, para ilustrar el funcionamiento de la ruta de síntesis y señalización del SA.

Los genes *PAD4* y *EDS1* son necesarios para la activación de la ruta frente a algunos estímulos (Falk y col., 1999; Zhou y col., 1998). Codifican proteínas con similitud a triacilglicerol lipasas y se cree que pueden estar implicados en la síntesis o en la degradación de alguna molécula señalizadora.

En cuanto a la síntesis de SA, *SID2* codifica la isocorismato sintasa (ICS) y los mutantes de *Arabidopsis sid2* muestran una dramática reducción del ácido salicílico. De esto se deduce que, al menos en *Arabidopsis*, la mayor parte del SA se produce a partir del ácido isocorismático (Wildermuth y col., 2001) y no de la fenilalanina, a través de la enzima PAL (fenilalanina amonioliasa) (Verberne y col., 1999) como se había descrito en un principio (Yalpani y col., 1993; Coquoz y col., 1998; Leon y col., 1995; Mauch-Mani & Slusarenko, 1996; Ribnicky y col., 1998). A esta última ruta se debe probablemente la pequeña cantidad de salicílico que queda en los mutantes *sid2* (Wildermuth y col., 2001). *EDS5* también es necesario para la producción del SA en respuesta al ataque de un patógeno (Nawrath y col., 1999). Codifica un transportador de intermediarios fenólicos de la ruta de biosíntesis del SA (Nawrath y col., 2002) y de hecho, la mutación *eds5* produce un efecto muy similar a la mutación *sid2* (Glazebrook y col., 2003).

En la mayoría de los casos se precisa en el núcleo la proteína NPR1 funcional para que se produzca la inducción de las proteínas de defensa clásicas (PR1, PR2, PR5, etc, descritas en subsiguientes apartados). Así, las plantas que contienen mutaciones en el gen *NPR1* (*non-expressor of PR1*; Cao y col., 1994) también denominado *NIM1* (*non-inducible immunity 1*; Delaney y col., 1995) o *SAI1* (*salicylic acid insensitive 1*; Shah y col., 1997), que actúa posteriormente a la acumulación de SA, presentan una elevada susceptibilidad a diversos patógenos (Glazebrook y col., 1996; Reuber y col., 1998; Feys & Parker, 2000). El gen *NPR1* se expresa en toda la planta a bajos niveles, que se incrementan 2 ó 3 veces como consecuencia de una infección o tras el tratamiento con SA (Cao y col., 1997). La expresión de *NPR1* parece venir mediada por factores de transcripción WRKY, ya que mutaciones en los sitios de unión de estos elementos en el promotor de *NPR1* reprimen su expresión (Yu y col., 2001a; Durrant & Dong, 2004; Dong, 2004). Cuando los niveles de SA son bajos, NPR1 existe en forma oligomérica en el citoplasma. Cuando suben los niveles de SA los oligómeros se disocian en monómeros, debido a la reducción de los puentes disulfuro que los unen. Los monómeros entran entonces en el núcleo e interaccionan con factores de transcripción tipo TGA (Despres y col., 2003; Fan & Dong, 2002; Jonhson y col., 2003; Kinkema y col., 2000; Mou y col., 2003; Zhang y col., 1999). Los factores TGA actúan sobre la transcripción mediante

su unión a la secuencia activadora-1 (*as-1*, *activating sequence factor 1*) El gen *PR1* contiene dos elementos del tipo *as-1* (Despres y col., 2000). No obstante, aunque los factores *TGA* y *NPR1* se expresan constitutivamente, la interacción *in vivo* requiere la inducción por SA (Heil & Badwin 2002). Se han encontrado homólogos de *NPR1* en arroz, tabaco, tomate, manzana y cítricos, lo cual parece indicar que la función de *NPR1* está muy conservada (Chern y col., 2001; Liu y col., 2002; Durrant & Dong, 2004).

El mutante recesivo de *Arabidopsis sni1* (*suppressor of npr1-1 inducible 1*) restablece la expresión de *PRs* mediadas por SA y la resistencia a patógenos en el fondo genético *npr1* (Li y col., 1999). *SNI1* parece actuar como regulador negativo de la expresión de *PRs* y de SAR, actuando después de *NPR1*. *SNI1* codifica una proteína que parece estar muy conservada, pues se han encontrado homólogos en numerosas especies vegetales. Su acción sobre los genes *PR* podría venir mediada por su unión a factores WRKY (Lebel y col, 1998; Eulgem y col., 1999; Yang y col., 1999).

Por otra parte, hay evidencias que ponen de manifiesto que algunas *PRs* pueden activar las respuestas defensivas sin mediar *NPR1* (Uquillas y col., 2004; Shirano y col., 2002; Zhang y col., 2003). Asimismo, existen pruebas de que el SA está implicado en la activación de *PRs* dependiente de sacarosa, pero independiente de *NPR1* (Thibaud y col., 2004). Los factores de transcripción de la familia *Whirly* (*Why*) parecen buenos candidatos como mediadores en la expresión de *PRs* independiente de *NPR1* (Desveaux y col., 2004). A pesar de que algunos promotores de los genes de respuesta temprana a SA contienen elementos *as-1* funcionales, en un estudio realizado por Uquillas y colaboradores (2004) se demostró que la activación de estos genes se realiza de forma independiente de *NPR1*, sugiriendo que la regulación de las respuestas tempranas y tardías al SA se producen por diferentes mecanismos.

Por otra parte, el SA exógeno promueve dos fases de expresión génica. En la primera, que ocurre entre 2 y 3 horas después del tratamiento, se expresan enzimas detoxificantes (Glutathion S-transferasas, glucosiltransferasas, ect) que ayudan a proteger las células del estrés oxidativo (Uquillas y col., 2004). En la segunda, se produce la activación de genes *PR* dependiente de *NPR1* y ocurre entre 12 y 16 horas después de la aplicación de SA (Horvath & Chua 1996). La primera fase generaría un ambiente reductor en la célula, que promueve la escisión de los oligómeros de *NPR1* y la entrada de los monómeros en el núcleo (Mou y col., 2003).

La ruta del SA incluye muchos bucles de retroalimentación, cuya función sería la de amplificar las señales defensivas; La muerte celular promueve la producción de

salicílico y viceversa. Se han encontrado algunas proteínas que se unen al ácido salicílico de forma específica y que presentan actividad catalasa, denominadas SA *binding proteins* o SABP (Chen y col., 1993), la ascorbato peroxidasa (APX) (Durner & Klessig, 1995) y la anhidrasa carbónica (SABP3) (Slaymaker y col., 2002). Se especula con que el SA inhibe la actividad de estas enzimas antioxidantes, provocando así un incremento del peróxido de hidrógeno en el interior de la célula (Durrant & Dong, 2004). De hecho, muchos mutantes que presentan altos niveles de SA y la expresión constitutiva de genes de defensa, además de resistencia a enfermedades, también presentan fenotipos denominados "lesion mimic". Es decir, desarrollan muerte celular espontánea en ausencia de ataque patogénico. *PAD4* y *EDS1* parecen funcionar en un bucle de retroalimentación positivo que amplifica, no sólo su propia expresión, sino también la producción de SA tras la infección, que a su vez induce la expresión de estos genes (Falk y col., 1999; Jirage y col., 1999; Feys y col., 2001). En plantas mutantes de *Arabidopsis npr1*, los niveles de SA tras una infección son más altos que en las plantas silvestres, sugiriendo que *NPR1* funciona regulando los niveles de SA y responde a altos niveles del mismo (Shah y col., 1997).

La infección de plantas de tomate y de ortiga con el viroide *citrus exocortis viroid* (CEVd) y con el virus del mosaico del tabaco (TMV) resulta en una interacción compatible, no necrotizante, en la que no sólo se acumula el SA, sino también el ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), un derivado metabólico inmediato del SA (Conejero y col., 1990, Bellés y col., 1999). El ácido gentísico está asociado con interacciones compatibles en las que no se produce HR (Bellés y col., 1999; Bellés y col., 2006). Los autores proponen que la ausencia de acumulación de ácido gentísico en las interacciones necrotizantes, tales como tomate-*P.syringae*, podría implicar una inhibición de la conversión de SA en ácido gentísico. Además, se ha observado que a pesar de que el SA y el ácido gentísico están relacionados biosintéticamente, cada uno induce diferentes proteínas de defensa, lo que refuerza la idea de que las dos señales pueden actuar de manera complementaria (Bellés y col., 2006). El ácido gentísico, además de inducir proteínas de defensa, tiene actividad antimicrobiana *in vitro* (Lattanzio y col., 1994)

Ruta del ácido jasmónico

El ácido jasmónico (JA) es un producto de la ruta de las oxilipinas que está implicado en varios aspectos de la biología de las plantas. Es importante en la fertilidad (desarrollo del polen y semillas), así como en la respuesta a herida y al ataque de insectos (Creelman & Mullet, 1997; Ecker, 1995; Li y col., 2001;

Reymond & Farmer, 1998). La señalización dependiente de JA también se produce a través de un incremento de su síntesis en respuesta al ataque del patógeno y la consecuente expresión de una serie de efectores de defensa.

Mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectados en la producción de JA, como el triple mutante *fatty acid desaturase* (*fad3/fad7/fad89*) o en su percepción, como *Jasmonic acid resistant 1* (*jar1*) y *coronatine insensitive* (*coi1*), exhiben una marcada susceptibilidad a patógenos necrótrofos, como los hongos *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* o *Phyitium* sp. y a bacterias, como *Erwinia carotovora* (Feys y col., 1994; Gibson y col., 1994; Penninckx y col., 1996; Staswick y col., 1992; Xie y col., 1998). Esta mayor susceptibilidad coincide con una disminución en los niveles de expresión de algunos genes inducibles por JA, tales como la "*plant defensin 1.2*" (*PDF1.2*), "*thionin 2.1*" (*THI2.1*), "*hevein-like protein*" (*HEL*), "*vegetative storage protein*" (*VSP*) o *chitinase B* (*CHIB*).

JAR1 codifica una JA-amino sintasa que puede formar conjugados entre el JA y muchos aminoácidos, incluyendo la isoleucina (Staswick & Tiryaki, 2004; Staswick y col., 2002). El conjugado con isoleucina (JA-Ile) podría ser la forma activa del jasmónico para muchas señalizaciones, incluyendo la defensiva (Staswick & Tiryaki, 2004). Todas las funciones del JA conocidas en *Arabidopsis* requieren la función de *COI1*, que codifica una proteína que se cree que participa en la ubiquitination de proteínas para su eliminación (Xie y col., 1998). Recientemente se ha demostrado que el JA-Ile induce la degradación mediada por *COI1* de varios miembros de la familia de represores transcripcionales JAZ (*jasmonate ZIM-domain*), que tendrían como diana genes de respuesta a JA, como *MYC2* (Chini y col., 2007; Thines y col., 2007). *MYC2/JIN1* codifica un factor de transcripción cuya expresión es rápidamente inducida por JA, siendo dependiente de *COI1*. El análisis por pérdida y ganancia de función ha demostrado que *MYC2* es un regulador transcripcional de la señalización mediada por JA, reprimiendo la respuesta defensiva frente a patógenos necrótrofos (regulando la expresión de *PDF1.2*). Por otro lado, activa las respuestas a estrés oxidativo, a la herida o al ataque de insectos, en las que además está involucrado el etileno (Chini y col., 2007; Dombrecht y col., 2007; Lorenzo y col., 2004; McGrath y col., 2005).

Algunas respuestas a JA requieren, además, la MAP quinasa *MPK4*, dado que los mutantes de *Arabidopsis mpk4* no expresan *PDF1.2* ni *THI2.1*, en respuesta al tratamiento con JA (Petersen y col., 2000). También se ha observado la implicación de la serín/treonín quinasa *BIK1* en la resistencia a necrótrofos mediada por JA. Este gen es inducido tanto por JA, como tras la infección por *B. cinerea* y su

inactivación causa una atenuación de la inducción de *PDF1.2*, que lleva consigo un incremento de la susceptibilidad al hongo (Veronese y col., 2006).

Se ha comprobado que los señalizadores derivados de los ácidos grasos también afectan a la expresión de *PDF1.2*. El mutante *ssi2*, que es deficiente en una "stearoyl-acyl carrier protein desaturase" y presenta niveles reducidos de ácido oleico, tiene comprometida la expresión de *PDF1.2*. Sin embargo, no tiene afectada la producción de JA en respuesta a la infección, ni tampoco el fenotipo típico de acortamiento de la raíz, producido por JA. Estos resultados sugieren que *ssi2* debe afectar a otra señal que actúa en conjunción con el JA (Kachroo y col., 2003).

Ruta del etileno

La síntesis de etileno (ET) en las plantas y la señalización dependiente de él ocurren a través de una ruta bien conservada que produce, en último término, una cascada de factores de transcripción que regulan diferencialmente las respuestas mediadas por etileno, incluyendo los mecanismos de defensa contra patógenos (Figura I.8., Broekaert y col., 2006).

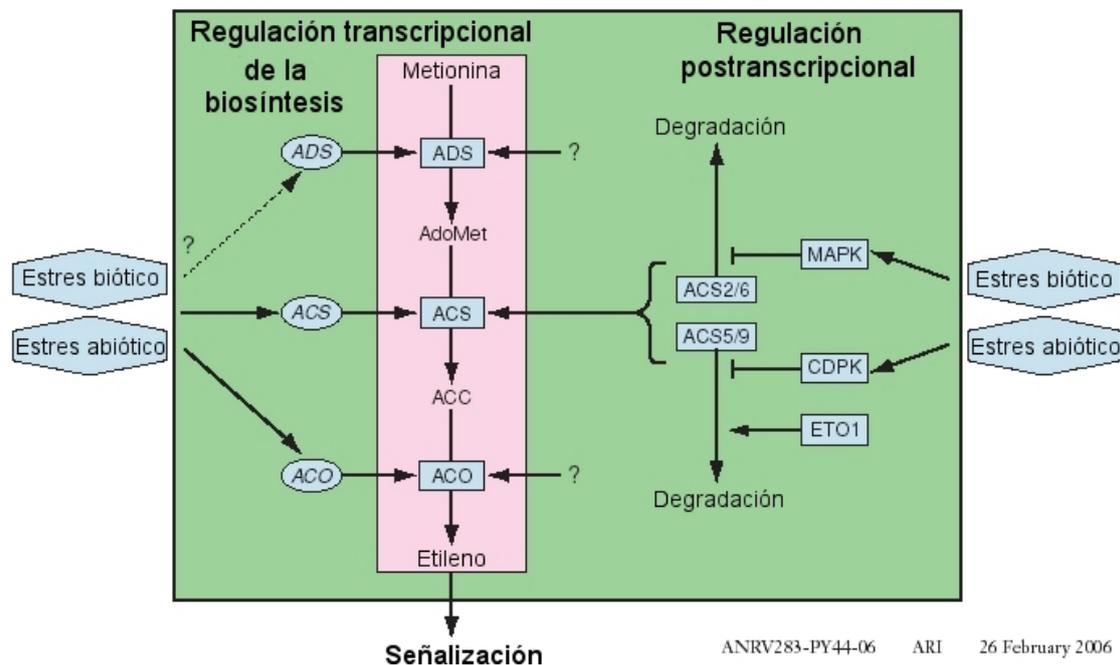


Figura I.8. Esquema de la ruta de biosíntesis de etileno. Figura adaptada de Broekaert y colaboradores, 2006.

El etileno se sintetiza a partir de la metionina, que es convertida a S-adenosil-metionina por la S-AdoMet sintasa (ADS). La S-adenosil-metionina es el mayor donante de grupos metilo en plantas y está implicada en reacciones de metilación,

tanto de lípidos, como de proteínas y de ácidos nucleicos (Kende, 1993; Fontecave y col., 2004). La S-adenosil-metionina es convertida en 5'-metiltioadenosina por la enzima ACC sintasa (ACS) y a través del ciclo de Yang, vuelve a producir metionina y ácido 1-aminociclopropano (ACC), un ácido carboxílico precursor del etileno. El ACC es oxidado por la ACC oxidasa (ACO) dando lugar a etileno, cianuro y dióxido de carbono. La conversión llevada a cabo por la ACS se considera la etapa limitante del proceso de síntesis.

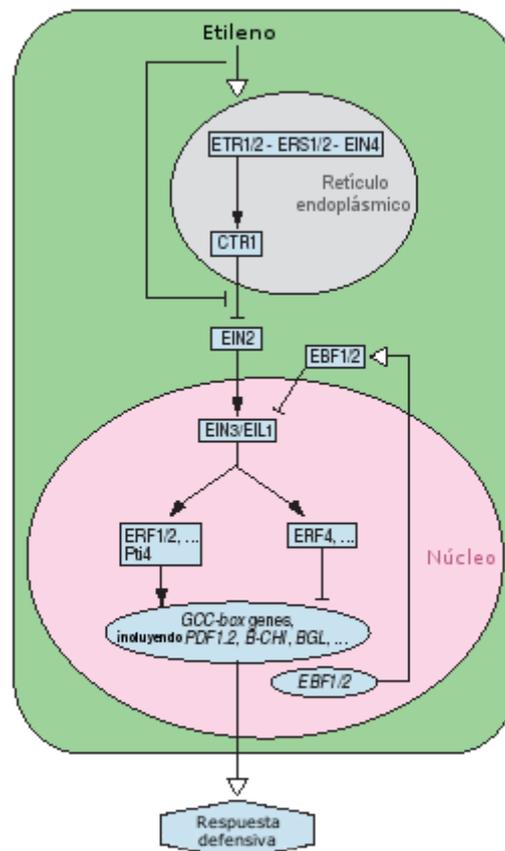
Las ACSs son codificadas por familias multigénicas (Bleecker & Kende, 2000). El gen *AtACS2* es inducido por *P. syringae*, *B. cinerea* y *A. brassicicola*, mientras que *AtACS5* y *AtACS11* tienden a ser reprimidos tras la inoculación con *P. syringae* (Zimmermann y col., 2004). Además de la regulación transcripcional, la regulación postranscripcional parece ser clave en la producción de etileno. Probablemente el último paso para dirigir la ACS hacia su degradación sea su fosforilación. Por ejemplo, la ACS de tomate *LeACS2* es fosforilada por una quinasa dependiente de calcio (CDPK) presente en extractos de frutos de tomate heridos (Tatsuki & Mori, 2001). Recientemente otro estudio en *Arabidopsis* reveló que la activación de la ruta de la MAPK6 fosforila a la *AtACS6* y a la *AtACS2*, estabilizándolas *in vivo* e inhibiendo así su degradación en respuesta al ataque de un patógeno (Liu & Zhang, 2004; Chae & Kieber, 2005). Por otra parte, se ha demostrado en tabaco que ambas rutas no son independientes, sino que la activación de ambas controla la respuesta a estreses abióticos y bióticos (Ludwig y col., 2005).

Las ACOs son una familia multigénica cuyos miembros se expresan diferencialmente durante el desarrollo de la planta y en respuesta a un ataque patogénico o a estrés abióticos (Cohn & Martin, 2005; Moeder y col., 2002; Nakatsuka y col., 1998; Nie y col., 2002; Woltering y col., 2005). Los factores de virulencia de *P. syringae* pv. *Tomato*, *AvrPto* y *AvrPtoB*, inducen específicamente los genes *LeACO1* y *LeACO2* (Cohn & Martin, 2005). En *Arabidopsis*, hay genes ACO inducidos por el tratamiento con etileno y posterior inoculación con *B. cinerea*, mientras que hay otro que tiende a ser reprimido tras la inoculación con *P. syringae* y *A. brassicicola* (Zimmermann y col., 2004).

Una vez el etileno es percibido por la célula, la señal es transmitida a través de una ruta bien conservada (representada en la figura I.9.), cuyos componentes se descubrieron mediante el rastreo de mutantes de *Arabidopsis*.

Éstos se clasificaron como insensibles o de respuesta constitutiva a etileno, según si mostraban o no la triple respuesta, consistente en la inhibición del crecimiento y adelgazamiento radial del hipocotilo, la elongación de la raíz y el curvamiento del gancho apical (Chen y col., 2005; Stepanova & Alonso, 2005).

Así se identificaron 5 receptores: ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4, siendo el dominio más conservado la parte N-terminal, que es la responsable de la unión a etileno, al menos para ETR1 y ERS1 (Hall y col., 2000; Rodríguez y col., 1999). Estos receptores se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico (Chen y col., 2005) y parecen actuar como represores de las respuestas a etileno, siendo inhibidos por esta hormona (Hua & Meyerowitz, 1998; Rodríguez y col., 1999, Schaller & Bleecker, 1995).



ANRV283-PY44-06 ARI 26 February 2006

Figura I.9. Esquema de la señalización en plantas dependiente de etileno. Figura adaptada de Broekaert y colaboradores, 2006.

También se ha sugerido una posible regulación post-transcripcional para *ETR1*, aunque no se conoce el mecanismo (Chen y col., 2005). El mutante *etr1-1* de *Arabidopsis* presenta una mayor susceptibilidad a diversos patógenos necrótrofos como *Chalara elegans*, *Fusarium oxisporum* y *Verticillium dahliae* (Geraats y col., 2003; Veronese y col., 2003), aunque resulta más resistente a *Phytophthora* spp., otro

necrótrofo (Geraats y col., 2002). También parece que la resistencia frente a *Erwinia* y *Plectosphaerella* requiere la participación del etileno, puesto que el mutante *ein2.5* (*ethylene insensitive 2*) es susceptible a estos patógenos, siendo más resistente que las plantas silvestres a la infección por *P. syringae* y *X. campestris* pv *Campestris* (Bent y col., 1992). El mutante *ein2.5* también es más susceptible a *B. cinerea*, así como *ein2.1* y *ein3.1* (Thomma y col., 1999a; Berrocal-Lobo y col., 2002). En tabaco se han obtenido plantas transgénicas insensibles a etileno mediante la transformación con el gen mutante del receptor de etileno *etr1-1* de *Arabidopsis*. Estas plantas también han resultado más susceptibles a diversos patógenos necrótrofos, incluido *B. cinerea* (Knoester y col., 1998; Geraats y col., 2002; Geraats y col., 2003). En cambio, estas plantas han mostrado mayor resistencia a biótrosos (Geraats y col., 2003).

El papel del etileno en la respuesta defensiva de la planta ha sido motivo de controversia, pero la idea más aceptada hoy en día es que el ET podría regular el desarrollo de los síntomas de manera positiva o negativa, dependiendo de la interacción planta-patógeno (van Loon y col., 2006b). En el caso de *B. cinerea* se había observado que el ET parece promover la enfermedad en hojas de tomate y pimiento (Elad, 1993), en cambio, en zanahoria parece estar implicado en la resistencia (Hoffman y col., 1988). Sin embargo, otros autores observaron que en tomate las rutas de respuesta dependientes de etileno parecen tener un papel importante en la resistencia a *B. cinerea* (Diaz y col., 2002). De hecho, se construyó una línea transgénica deficiente en la producción de etileno (Klee y col., 1991) que resultó ser más susceptible a *B. cinerea* (Diaz y col., 2002) y más tolerante al hemibiótrofo *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (Lund y col., 1998) y al necrótrofo *V. dahliae* (Robison y col., 2001). Inversamente, el mutante *Epinastic* (*Epi*), que tiene activadas de forma constitutiva una serie de respuestas al etileno, resulta más resistente a *B. cinerea*. Consistentemente con estas observaciones, el pretratamiento con etileno protegió a las plantas de tomate contra *Botrytis*, mientras que al inhibir la percepción del etileno mediante el tratamiento con metil-ciclopropeno o 2,5-norbornadieno, las plantas se volvieron susceptibles (Diaz y col., 2002).

Diversas observaciones indican que cuando el ET es aplicado antes de la inoculación con el patógeno no tiene efecto o bien reduce el avance de la infección, mientras que si las plantas son tratadas después, los síntomas de la infección se aceleran (van Loon y col., 2006b). Parece que la cantidad de ET necesaria para el establecimiento y regulación de las respuestas defensivas apropiadas es variable, lo que puede haber promovido la evolución de los patógenos en función del nivel de

etileno con el que pueden alterar la respuesta de la planta en su beneficio (Aloni y col., 1998; Adie y col., 2007)

Interacciones entre las rutas del JA y del ET

En general, las rutas de señalización dependientes de JA y de ET actúan sinérgicamente en las respuestas de defensa (Ellis & Turner, 2001; Penninckx y col., 1996; Pieterse y col., 1998), aunque se han obtenido indicios que sugieren un papel regulatorio de una ruta sobre la otra (Kunkel & Brooks, 2002). Así, algunos de los genes regulados por JA también son regulados por ET, como por ejemplo *PDF1.2*, para cuya inducción son necesarias ambas rutas. Sin embargo, otros genes como el *VSP1*, que es inducible por JA, no necesita etileno (Norman-Setterblad y col., 2000).

El factor de transcripción *ERF1* integra las señales de las rutas del JA y del ET, puesto que su expresión requiere ambas hormonas, al igual que ocurre con *COI1* y con *EIN2* (Lorenzo y col., 2003). La sobreexpresión de *ERF1* produce la activación de genes relacionados con la defensa y revierte la deficiencia en la expresión de estos genes causada por las mutaciones *coi1* y *ein2* (Berrocal-Lobo y col., 2002; Lorenzo y col., 2003). Estos resultados sugieren claramente que *ERF1* actúa después de *COI1* en la activación de los genes.

JIN1 y *ERF1* regulan genes distintos, ya que los que son inducidos por *ERF1* son reprimidos por *JIN1* y hay un segundo grupo de genes que es activado por *JIN1* y reprimidos por *ERF1*. Los genes del primer grupo parecen importantes para la resistencia a enfermedades, puesto que la sobreexpresión de *ERF1* y las mutaciones en *JIN1* aumentan la resistencia a patógenos necrótrofos (Lorenzo y col., 2004).

Un estudio transcriptómico reciente ha identificado al menos diez miembros de la familia AP2/ERF que son inducidos después del tratamiento con MeJA y posterior inoculación con el patógeno incompatible *A. brassicicola*, incluyendo los reguladores positivos AtERF1/2 y el regulador negativo AtERF4, implicados en la ruta del ET (McGrath y col., 2005).

Interacciones entre las ruta del SA, JA y ET

Se ha demostrado que existe una relación muy compleja entre dichas rutas, ya que se han descrito ejemplos tanto de efectos positivos como negativos.

La mayoría de las interferencias entre la ruta del SA con las del JA y del ET consisten en una represión mutua (Glazebrook y col., 2003; Kunkel & Brooks, 2002; Schenk y col., 2000). Generalmente las alteraciones genéticas que implican

una mayor acumulación de SA también implican una menor respuesta a JA, como es el caso del mutante *mpk4* (Petersen y col., 2000) o del silenciamiento del gen de la clorofilasa 1 de *Arabidopsis AtCLH1* (Kariola y col., 2005). En tabaco el JA inhibe la expresión de genes dependientes de SA (Niki y col., 1998) y en tomate el efecto inhibitorio del SA sobre la señalización mediada por JA ha sido demostrada en numerosos trabajos, en donde la acción del SA bloquea la expresión de genes inducibles por JA (Doares y col., 1995b; Penacortes y col., 1993). La regulación negativa entre ambas rutas también se refleja en la respuesta final de la planta a la enfermedad. Por ejemplo, la sobreexpresión de *AtERF1* en *Arabidopsis* incrementa la resistencia mediada por ET a *B. cinerea*, pero reduce la resistencia mediada por SA a *P. syringae* pv. *Tomato* (Berrocal-lobo y col., 2002).

En algunos casos las rutas del ET y del JA parecen actuar independientemente de la ruta del SA. Se ha demostrado que mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en la percepción del JA o del ET son completamente capaces de activar las respuestas dependientes de SA (Penninckx y col., 1998; Thomma y col., 1998; Thomma y col., 1999a) o de inducir la expresión de genes regulados por él (Glazebrook y col., 2003). Por otra parte, mutantes deficientes en la síntesis de SA (*sid2* y *eds5*) o en su señalización (*npr1/nim1*) tienen bloqueada la expresión de los genes *PR* dependientes de SA, pero muestran la misma o incluso mayor inducción de los genes *PR* dependientes de JA o ET (Glazebrook y col., 2003; Thomma y col., 2001). Por otra parte, aunque escasas, hay interacciones en las que la expresión de algunos genes de defensa precisa de la activación concomitante de ambas rutas, sugiriendo que las dos señalizaciones regulan coordinadamente la expresión de, al menos, una parte de las respuestas defensivas (Schenk y col., 2000; Xu y col., 1994).

Los resultados más recientes sugieren que ambas rutas interactúan en múltiples puntos. De hecho, la represión por SA de la expresión de genes inducidos por JA requiere la función de NPR1, pero no su localización nuclear. Esto sugiere que esta proteína podría mediar este antagonismo mediante una función citosólica, presumiblemente distinta de la función nuclear desempeñada en la ruta del SA (Spoel y col., 2003). El factor de transcripción WRKY70 también podría ser un punto de interferencia, ya que su sobreexpresión causó la activación constitutiva de la ruta del SA, mientras que su silenciamiento produjo la activación de los genes dependientes de *COI1* (Li y col., 2004). El hecho de que estos fenotipos no conlleven alteraciones en los niveles de SA y JA sugiere que el factor WRKY70 está afectando a genes regulados por JA y por SA en un punto posterior a la producción de ambas fitohormonas.

Hasta la fecha no se ha encontrado que los componentes primarios de la ruta de señalización dependiente de ET, descritos anteriormente (ETR, ERS, EIN4, CTR, EIN2, EIN3/EIL), respondan a otras señales (Alonso & Stepanova, 2004; Glazebrook, 2005; Gagne y col., 2004). Por lo tanto, los puntos de ramificación que conectarían las rutas tienen que ser posteriores a *EIN3/EIL*.

En cuanto al reconocimiento del patógeno, existe algún caso de interacción gen a gen, como es el caso del gen de resistencia *Pto* de tomate, en el que hay conexión con genes dependientes de ET y de SA. Sin embargo hay mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la señalización de etileno, como *etr1* y *ein2*, que no han perdido su resistencia no-huésped contra los biótrosos *P. parasitica* y *P. syringae*, sugiriendo que el ET no es necesario para este tipo de resistencia (Lawton y col., 19994; Lawton y col., 1995; Pieterse y col., 1998).

Participación de otras hormonas en los mecanismos de defensa

Hoy en día la visión tradicional de la interacción planta-patógeno regulada por las tres hormonas SA, JA y ET es válida, pero demasiado simplificada (Robert-Seilaniantz y col., 2007). Los estudios más recientes sugieren una realidad más compleja y evidencian la implicación de otras hormonas en la interacción planta-patógeno.

Diversas observaciones apuntan a que los patógenos podrían activar la ruta de las auxinas para desarrollar su virulencia. De hecho, O'Donnell y colaboradores (2003) detectaron un rápido aumento en los niveles de auxinas, además del incremento en SA, JA y ET, durante la infección de *Arabidopsis* con *X. campestris* pv. *Campestris* y *P. syringae* pv. *Tomato* DC3000 (PstDC3000). Schmelz y colaboradores (2003) confirmaron que PstDC300 inducía genes de biosíntesis de auxinas, además de inducir la síntesis de ácido abscísico (ABA). También se demostró que AvrBs3, un efector tipo III de *X. campestris* pv. *Vesicatoria*, podía inducir genes de respuesta a auxinas para provocar hipertrofia celular (Marois y col., 2002). Se obtuvieron resultados similares para AvrRpt2, efector tipo III de *P. syringae*, que alteraba la fisiología de las auxinas en ausencia del gen R correspondiente (Kunkel y col., 2004). Recientemente Navarro y colaboradores (2006) demostraron que la inducción de la señalización por auxinas hacía a las plantas más susceptibles a PstDC300 y que al atenuar esa señalización, por silenciamiento de los receptores de auxinas, aumentaba su resistencia. Además, el tratamiento con auxinas sintéticas incrementaba los síntomas cloróticos, sin afectar a la proliferación bacteriana. También se ha observado que las proteínas del TMV podrían promover la señalización por auxinas para causar los síntomas de la enfermedad, ya que su

replicasa interacciona con componentes de la señalización por auxinas (Padmanabhan y col., 2005 ayb; Padmanabhan y col., 2006).

Independientemente de los mecanismos de inducción de respuestas, muchos patógenos de plantas son capaces de producir auxinas, como por ejemplo *Ralstonia solanacearum*, y se ha demostrado que la mutación de los genes que regulan su síntesis reduce la virulencia del patógeno (Valls y col., 2006). Asimismo, la mutación en un gen biosintético de las auxinas en *Erwinia chrysanthemi* redujo los síntomas, aunque no el crecimiento bacteriano (Yang y col., 2007).

Por otra parte, se ha observado que la aplicación exógena a plantas de plátano de ácido indolacético (IAA), el precursor de la forma activa de la auxina, confiere resistencia frente a la infección por *Fusarium oxisporum* (Fernández-Falcón y col., 2003).

El papel de las citoquininas en la defensa de las plantas muestra similitudes con el de las auxinas (Robert-Seilaniantz y col., 2007). Ambas hormonas son producidas por patógenos biótrofos y están asociadas con la supresión de la HR (Murphy y col., 1997; Robinette & Matthysse, 1990). De hecho, muchos hongos patógenos biótrofos, como *Cladosporium fulvum*, *Blumeria graminis*, *Pyrenopeziza brassicae* y *Venturia inaequalis* producen citoquininas. Sin embargo, no se conocen hongos necrótrofos que las produzcan (Murphy y col., 1997; Walters & McRoberts, 2006).

Mediante análisis de *microarrays* se ha demostrado que *Plasmodiophora brassicae* reprime la ruta de degradación de citoquininas e induce la expresión de los receptores de estas hormonas (Siemens y col., 2006). Estos autores demostraron, además, que la sobreexpresión de la citoquinina oxidasa confería resistencia a la planta frente a dicho patógeno.

Las giberelinas (GAs), por su parte, parecen tener un efecto opuesto al de las auxinas y las citoquininas en la defensa de la planta. Las GAs promueven el crecimiento de la planta mediante la degradación de las proteínas DELLA, que son represores del crecimiento de la planta (Harberd, 2003). Los estudios más recientes han demostrado que la pérdida de función de las proteínas DELLA por mutación incrementa la resistencia de la planta a PstDC3000, mediante la potenciación de las rutas de defensa dependientes de SA (Navarro y col., 2008). Estos mismos mutantes son hipersusceptibles al patógeno necrótrofo *A. brassicicola*, sugiriendo que las proteínas DELLA promueven la resistencia a necrótrofos y la susceptibilidad a biótrofos, en parte, mediante la regulación del equilibrio entre las respuestas dependientes de SA, del JA y del ET (Navarro y col., 2008).

Los brasinosteroides también participan en la inducción de las defensas de las plantas. El tratamiento con brasinosteroides en tabaco y en arroz indujo resistencia frente a varios biótrofos, independientemente de la señalización mediada por SA

(Nakashita y col., 2003). Se ha propuesto que su efecto podría residir en una compleja interacción con otras hormonas de la planta (Krishna, 2003). De hecho, algunos hongos patógenos producen toxinas análogas a hormonas esteroides que modulan las rutas de respuesta a brasinosteroides en mamíferos (Kiesling, 1986). Aún no se conocen datos de la implicación de estas hormonas en la resistencia a necrótrofos (Robert-Seilaniantz y col., 2007)

Por último, cabe destacar que el ácido abscísico (ABA) parece jugar un papel crucial en las interacciones planta-patógeno. Se ha demostrado que, además de su implicación en la adaptación de la planta a estrés abiótico (Fujita y col., 2006), participa en la respuesta a estrés biótico. En algunos casos actúa como un regulador negativo de la resistencia de la plantas, como ocurre tras su aplicación en arroz, que aumenta la susceptibilidad a *Magnaporthe grisea* (Koga y col., 2004; Mauch-Mani & Mauch, 2005). Por otra parte, en *Arabidopsis* se han correlacionado los niveles de ABA con la susceptibilidad a PstDC3000 y a *Hyaloperonospora parasitica*, puesto que el mutante *aba1.1*, deficiente en ABA, era menos susceptible a la infección (Mohr & Cahill, 2003). Además, recientemente se ha encontrado que PstDC3000 estimula la producción de ABA durante la infección (Truman y col., 2006) y que los efectores tipo III de PstDC3000 también producen un aumento de los niveles de ABA (de Torres-Zabala y col., 2007). Por otra parte, la coronatina producida por *P. syringae* reprime la clausura de los estomas mediada por el ABA (Melotto y col., 2006). Más recientemente se ha demostrado que el ABA suprime la acumulación de SA y de lignina en la interacción *Arabidopsis*-PstDC3000 (Mohr & Cahill, 2007). Teniendo en cuenta estos resultados, el ABA parece actuar como un represor de la ruta del SA. De hecho, las plantas de tomate *sitiens*, insensibles al ABA, muestran un incremento en la respuestas dependientes de SA, así como una mayor resistencia a la infección por PstDC3000 (Audenaert y col., 2002b), por *P. syringae* pv. Tomato DCT6D1 (Thaler & Bostock, 2004), por *Erwinia Chrysanthemi* (Asselbergh y col., 2008), por *Oidium neolicopersici* (Achuo y col., 2006) y por *B. cinerea* (Audenaert y col., 2002b). Esto es consistente con el hecho de que la resistencia a *B. cinerea* en tomate esté mediada por SA y no por ET, como en *Arabidopsis*. Este patógeno tiene una fase inicial muy corta de biotrofismo en su ciclo vital, en la que es susceptible a los mecanismos de defensa mediados por SA.

El ABA también puede interferir con la ruta del JA y del ET. Los mutantes *ein2*, insensibles a etileno y más susceptibles a patógenos necrótrofos, producen más ABA (Ghassemian y col., 2000). Otros autores han encontrado que el mutante *aba2.1* es más resistente a *Fusarium oxysporum*, un necrótrofo, sugiriendo que las interacciones entre el ABA y el ET son antagónicas (Anderson y col., 2004). Inversamente, la mutación en *JIN1*, identificado inicialmente como un factor de

transcripción regulador de la señalización por ABA (Abe y col., 2003), produce además una inducción de las defensas mediadas por JA o ET, como *PDF1.2*, causando así una elevada resistencia a necrótrofos (Anderson y col., 2004). Los autores demostraron, además, que la aplicación exógena de ABA reprimía la inducción de genes de defensa regulados por JA o ET. La mutación *jin1*, sin embargo, reprimió los genes de respuesta a herida dependientes de JA (Lorenzo y col., 2004). También se ha encontrado que las proteínas DELLA inducen la expresión del gen *XERICO*, que codifica una ligasa y que en último término induce la síntesis de ABA y que antagoniza los efectos de las GAs (Zentella y col., 2007).

Es interesante destacar que el ABA también es producido por hongos saprófitos y parásitos, tales como los miembros del género *Botrytis*, *Ceratocystis*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Dörffling y col., 1984; Crocoll y col., 1991; Mauch-Mani & Mauch, 2005).

Todas estas observaciones sugerían que el ABA actuaba como represor de las defensas inducibles, tanto frente a biótrofos como a necrótrofos, por lo que su función en la planta podría ser priorizar las respuestas a estrésses abióticos (Robert-Seilaniantz y col., 2007). En la figura I.10 se ilustra de forma simplificada las interacciones entre las diferentes rutas de señalización descritas y el ABA.

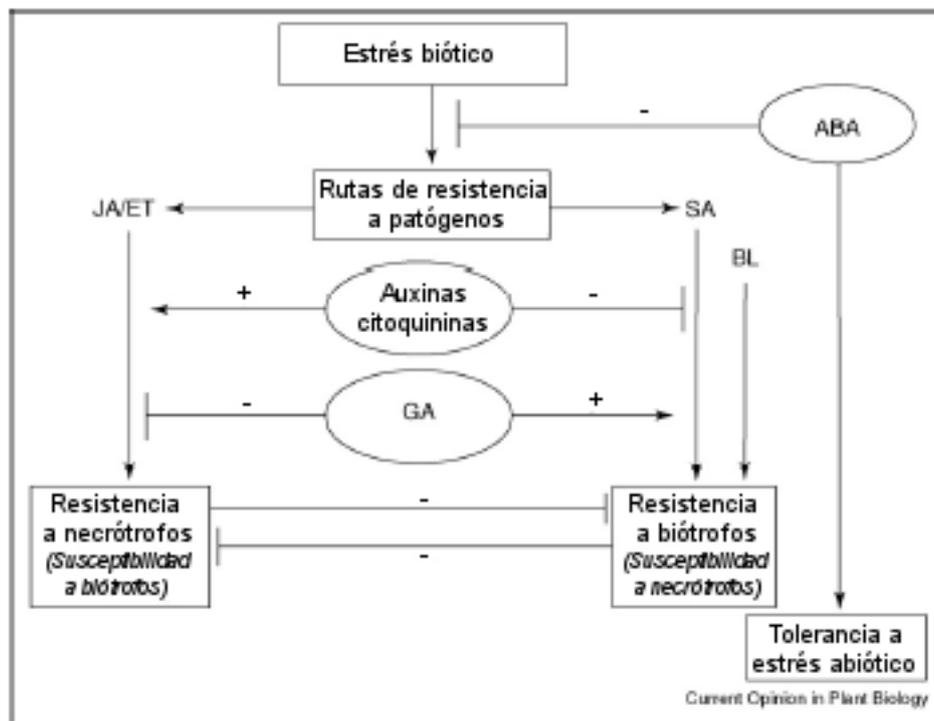


Figura I.10. Interacción del ABA con otras rutas de señalización. Figura adaptada de Robert-Seilaniantz y colaboradores, 2007.

Sin embargo, también se han observado efectos positivos del ABA sobre las defensas de las plantas (Mauch-Mani & Mauch, 2005). Un estudio muy reciente muestra la interrelación existente entre la señalización mediada por ABA, SA y JA, en la interacción de *Arabidopsis* con el hongo necrótrofo *Alternaria brassicicola* (Flors y col., 2008). La infección produce una represión del ABA y los autores sugieren que éste podría ser un mecanismo de virulencia del patógeno. Consistentemente, el mutante deficiente en la producción de ABA *npq2* es más susceptible a *A. brassicicola*. Por tanto, el papel del ABA en la defensa general de las plantas sigue sin estar claro y parece depender, en gran medida, del modo de acción del patógeno.

Por último, se ha propuesto recientemente una conexión entre el ABA y la composición de la pared celular (Hernández-Blanco y col., 2007). Los autores observaron una inducción constitutiva de los genes de síntesis y de respuesta al ABA en plantas de *Arabidopsis* mutadas en los genes que codifican subunidades de la celulosa sintasa *CESA4/IRX5* y *CESA8/IRX1*, una enzima necesaria para la formación de la pared celular secundaria. Los mutantes deficientes en esos genes, "no wilt symptoms" (*nws2*) y "enhanced resistance to necrotrophs" (*ern1*), respectivamente, mostraban además resistencia a *B. cinerea*, entre otros patógenos.

Las respuestas defensivas de las plantas: genes PR

Las rutas de señalización promueven, en última instancia, varios mecanismos de defensa que incluyen el reforzamiento de las paredes celulares, la producción de fitoalexinas y la síntesis de proteínas relacionadas con la defensa. Estas proteínas han suscitado gran interés en investigación y varias de ellas se usan como marcadores de las rutas de respuesta de las plantas. Por ello, a continuación se incluye una descripción detallada de las mismas.

La mayoría de las proteínas implicadas en la defensa de las plantas forman parte de las denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), ya que son inducidas en asociación con las respuestas de resistencia, aunque ello no siempre implica un papel funcional en la defensa (van Loon y col., 2006). Algunas PRs son producidas bajo condiciones fisiológicas específicas, acumulándose en hojas senescentes, incluso cuando empieza la clorosis y también en frutos en maduración (Buchanan-Wollaston y col., 2003; Davoine y col., 2001; Quirino y col., 2000). Así mismo, algunas PRs son inducidas por estrés abióticos, tales como la herida o el frío (Hon y col., 1995), e incluso pueden modular la formación de hielo y

actuar como anticongelantes (Griffith y col., 2005; Griffith & Yaish, 2004). Por tanto, estas proteínas constituyen un grupo muy heterogéneo, cuyo modo de acción se desconoce en muchos casos. Se ha observado inducción de PRs en muchas especies vegetales pertenecientes a diferentes familias, lo cual indica un papel general de estas proteínas en la adaptación a condiciones de estrés biótico (van Loon y col., 2006a). Las PRs y proteínas similares se han clasificado en 17 familias, aunque no todas parecen estar representadas en las distintas especies de plantas y la incidencia y propiedades de los diferentes miembros dentro de una familia pueden diferir notablemente.

Table 1 Recognized families of pathogenesis-related proteins

| Family | Type member | Properties | Gene symbols |
|--------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
| PR-1 | Tobacco PR-1a | Unknown | <i>Ypr1</i> |
| PR-2 | Tobacco PR-2 | β -1,3-glucanase | <i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')] |
| PR-3 | Tobacco P, Q | Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII | <i>Ypr3</i> , <i>Cbia</i> |
| PR-4 | Tobacco 'R' | Chitinase type I, II | <i>Ypr4</i> , <i>Cbid</i> |
| PR-5 | Tobacco S | Thaumatococcus-like | <i>Ypr5</i> |
| PR-6 | Tomato Inhibitor I | Proteinase-inhibitor | <i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pim</i> ') |
| PR-7 | Tomato P ₆₉ | Endoproteinase | <i>Ypr7</i> |
| PR-8 | Cucumber chitinase | Chitinase type III | <i>Ypr8</i> , <i>Cbib</i> |
| PR-9 | Tobacco "lignin-forming peroxidase" | Peroxidase | <i>Ypr9</i> , <i>Prx</i> |
| PR-10 | Parsley "PR1" | Ribonuclease-like | <i>Ypr10</i> |
| PR-11 | Tobacco "class V" chitinase | Chitinase, type I | <i>Ypr11</i> , <i>Cbi</i> |
| PR-12 | Radish Rs-AFP3 | Defensin | <i>Ypr1</i> |
| PR-13 | Arabidopsis THI2.1 | Thionin | <i>Ypr13</i> , <i>Tbi</i> |
| PR-14 | Barley LTP4 | Lipid-transfer protein | <i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i> |
| PR-15 | Barley OxOa (germin) | Oxalate oxidase | <i>Ypr15</i> |
| PR-16 | Barley OxOLP | Oxalate-oxidase-like | <i>Ypr16</i> |
| PR-17 | Tobacco PRp27 | Unknown | <i>Ypr17</i> |

Further details can be found at <https://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.htm>.

Annu. Rev. Phytopathol. 2006. 44:7.1-7.28

Tabla 1.1. Familias de proteínas relacionadas con la patogénesis. Figura de van Loon y colaboradores, 2006.

La familia PR1 está muy conservada y parece estar representada en todas las especies de plantas estudiadas, sin embargo, su función es la menos conocida (Van Loon & Van Strien, 1999). En tabaco hay tres PR1, que son ácidas y extracelulares: PR1-a, PR1-b y PR1-c. En tomate, los ortólogos más relacionados son proteínas básicas (Van Loon y col., 1994). Estas observaciones ilustran cómo PRs que han sido clasificadas en la misma familia, por homología de secuencia, pueden tener diferentes propiedades y, por tanto, puede diferir sustancialmente su actividad biológica.

La mayoría de las proteínas PR poseen actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos *in vitro*, pero cuando son expresadas en plantas sólo reducen un número limitado de enfermedades, dependiendo de la naturaleza de la proteína, de la especie de la planta y del patógeno implicado. Por ejemplo, las plantas transgénicas de tabaco que expresan altos niveles de PR1-a muestran mayor tolerancia a *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* y a *Peronospora parasitica*, pero no exhiben resistencia a *P. syringae* pv. *tabaci* o a *Cercospora nicotianae* (Alexander y col., 1993). Estas observaciones proporcionaron una evidencia indirecta de que PR1 podría tener actividad antifúngica. PR1-c de tomate reduce *in vitro* la germinación y el crecimiento del tubo germinativo de *P. infestans* y su aplicación *in vivo* reduce el área de necrosis en discos de hoja (Niderman y col., 1995). La familia de las PR2, siendo β -1,3-endoglucanasas, junto con las familias PR3, PR4, PR8 y PR11, que son quitinasas, podría actuar contra hongos patógenos. Los miembros de la familia PR8 también poseen actividad lisozima, pudiendo actuar contra bacterias, mientras que las defensinas (PR12) y las tioninas (PR13), tienen una amplia actividad antibacteriana y antifúngica (Lay & Anderson, 2005; Thomma y col., 2002; Bohlmann, 1994; Epple y col., 1997). Algunas proteínas de transferencia de lípidos (PR14) tienen actividad antifúngica y antibacteriana (García-Olmedo y col., 1995). Sin embargo, en algunos casos, la expresión de estas PRs de forma transgénica podría ser más efectiva que la aplicación *in vitro*, ya que los elicitores liberados por el patógeno por acción de estas enzimas activarían las respuestas de las plantas (Boller, 1995; Yoshikawa y col., 1993). Las glucanasas y las quitinasas podrían actuar también sobre los sustratos endógenos de la planta, liberando moléculas señalizadoras, como los OGAs, que funcionarían como elicitores endógenos de mecanismos de defensa (van Loon y col., 2006a; Ferrari y col., 2007).

PR7 es una endoproteasa que constituye la PR más notable en tomate y podría ayudar en la disolución de la pared celular microbiana (Jordá y col., 2000). PR9 es un tipo específico de peroxidasa que podría actuar en el reforzamiento de la pared celular, catalizando la lignificación, aumentando así la resistencia a múltiples patógenos (Passardi y col., 2004)

Se ha demostrado que tras el ataque por el patógeno, las distintas hormonas interfieren en la expresión de muchas PRs, como ocurre por ejemplo en *Arabidopsis*, que al tratar con ET se necesita una menor concentración de SA para inducir PR1 (Lawton y col., 1994). Por otra parte, la aplicación simultánea de JA y SA en tabaco, reduce la inducción de PR1a por SA (Niki y col., 1998). Otras proteínas tipo PR son inducibles por JA y/o por ET (Van Loon, 2006a) y su incidencia puede ser regulada además por ABA (Audenaert y col., 2002b; Mauch-Mani & Mauch, 2005; Rezzonico y col., 1998; Zhu y col., 1993). Mientras que en

Arabidopsis parece estar claro que las familias PR1, PR2 y PR5 son inducibles por SA y PR3, PR4 y PR12 son inducibles por JA o ET (Thomma y col., 2001), en tabaco se ha demostrado que diferentes miembros de una misma familia están regulados diferencialmente por SA o por JA y ET (Niki y col., 1998; Seo y col., 2001). Las PRs con función anticongelante parecen estar reguladas por etileno (Yu y col., 2001b). Las isoformas básicas reguladas por el desarrollo, que están presentes en la vacuola, parecen estar reguladas y ser inducibles por JA y/o ET. Por ejemplo, las plantas de tabaco insensibles a ET no expresan las isoformas básicas PR1g, PR2d y PR5c, en respuesta a la infección por el TMV, mientras que la expresión local de las isoformas ácidas se ve afectada (Verberne y col., 2003). En tomate, los ortólogos básicos del tabaco PR1a, PR1b y PR1c están presentes en el apoplasto y son inducibles por SA.

Distintas clases de genes *PR* parecen ser regulados a través de los elementos GCC en sus regiones promotoras, incluyendo las β -1,3-glucanasas vacuolares (PR2), las quitinasas vacuolares básicas (PR3), las *hevein-like proteins* (PR4) y las defensinas (PDFs, PR12) (Broglie y col., 1989; Chakravarthy y col., 2003; Eyal y col., 1993; Lorenzo y col., 2003; Penninckx y col., 1996; Samac y col., 1990; Thomma y col., 1999a). La inducción de estos genes *PR* ocurre tanto en las zonas infectadas como sistémicamente, a través de una ruta en la cual el JA y el ET actúan sinérgicamente (Penninckx y col., 1998). Los recientes estudios de transcriptómica apoyan esta idea, puesto que en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el factor de transcripción de respuesta a etileno *AtERF1* o en plantas de tomate que expresan su ortólogo *Pti4*, se inducen muchos de estos genes *PR* (Lorenzo y col., 2003; Chakravarthy y col., 2003). Un estudio reciente de proteómica ha revelado la existencia de una nueva lipasa, GLIP1, secretada en *Arabidopsis* y que actúa como molécula efectora antimicrobiana dependiente de ET, siendo crítica en la resistencia frente al necrótrofo incompatible *A. brassicicola* (Oh y col., 2005).

Las defensinas de las plantas son, generalmente, pequeños péptidos básicos que tienen un patrón tridimensional característico, estabilizado por ocho cisteínas que forman puentes disulfuro. Estas defensinas inhiben el crecimiento de diversos hongos, tras unirse específicamente a receptores de membrana del patógeno (Thevissen y col., 2004). El gen de la defensina *PDF1.2* (grupo PR12) se utiliza como marcador de la ruta del JA y ET en las interacciones con *Arabidopsis* (Penninckx y col., 1996; Penninckx y col., 1998). Recientemente se han encontrado en el genoma de *Arabidopsis* 317 genes potencialmente codificantes de defensinas (*DEFL*, *defensine-like*) (Silverstein y col., 2005), incluyendo los 13 genes *AtPDF* que ya se conocían (Thomma y col., 2002). Entre los ya identificados hay una amplia

expresión diferencial en respuesta a SA, JA o ET y también a diferentes patógenos (Broekaert y col., 2006). Por ejemplo, los genes codificantes de las defensinas AtPDF1.2/a/b/c son inducidas por ET y JA y reprimidos por SA, mientras que *AtPDF1.4* no responde ni a ET ni a JA, pero es inducido por SA. El resultado del análisis de sus promotores es consistente con estas observaciones, puesto que las tres defensinas AtPDF1.2 tienen caja GCC en sus promotores, pero *AtPDF1.4* no. Por el contrario, *PDF1.5* parece insensible a cualquiera de las tres hormonas, a pesar de que también alberga una caja GCC en su promotor. Estos resultados sugieren que existe una red de transducción de la respuesta muy compleja, donde los diferentes grupos de defensinas responden a una o a más de una ruta de señalización (Broekaert y col., 2006).

Las respuestas defensivas de las plantas: las fitoalexinas

Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios. Globalmente las plantas producen más de 100.000 productos de bajo peso molecular, que se diferencian de los metabolitos primarios en que no son esenciales para la vida de la planta (Dixon, 2001). En la figura I.11 se muestran las relaciones entre las diferentes rutas de biosíntesis de estos metabolitos secundarios.

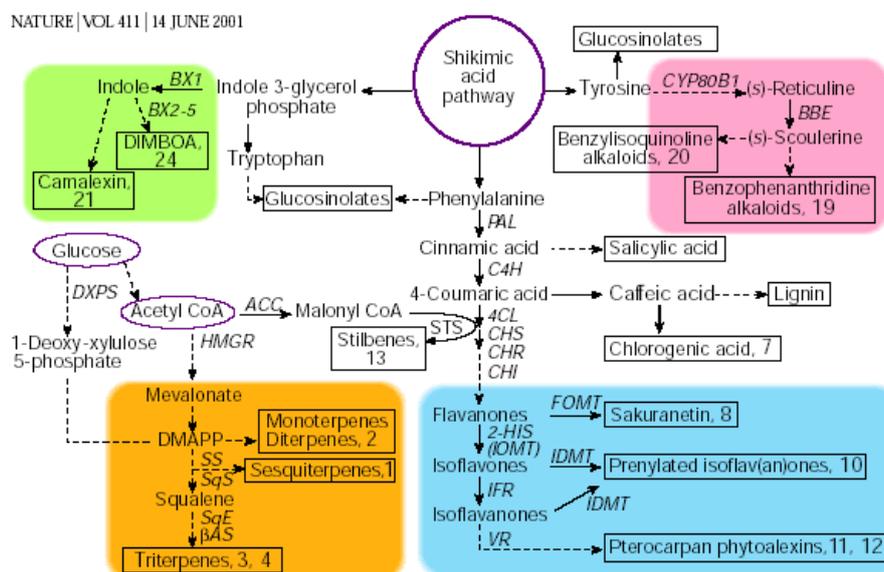


Figura I.11. Rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios en las plantas. Figura de Dixon, 2001.

Desde el punto de vista de la resistencia a patógenos, estos compuestos son clasificados como fitoanticipinas, las cuales son producidas de manera constitutiva o

fitoalexinas, cuya acumulación es inducible de manera que su concentración en los tejidos aumenta súbitamente en respuesta a patógenos o a tratamientos químicos (Harborne, 1999; Dixon, 2001). Algunos compuestos pueden ser considerados fitoanticipinas en unas especies y al mismo tiempo, fitoalexinas en otras. Un ejemplo de ello es la flavonona sakuranetina, que se acumula de forma constitutiva en los pelos glandulares de las hojas del grosellero negro, pero es el principal metabolito antimicrobiano inducible en las hojas de arroz (Kodama y col., 1992). En los casos en los que el metabolito constitutivo es producido en grandes cantidades, su clasificación podría depender de si la concentración constitutiva es suficiente para tener efecto antimicrobiano (Dixon, 2001).

Los fenilpropanoides forman un grupo principal de metabolitos secundarios, derivados de la fenilalanina, siendo su desaminación, catalizada por la fenilalanina amonioliasa (PAL), el primer paso de la ruta.

Los ácidos fenólicos son componentes importantes del sistema defensivo de las plantas y forman parte de las fitoanticipinas. Los ácidos fenólicos son diversos en su estructura y se caracterizan por tener anillos aromáticos hidroxilados. Se ha comprobado su acción biocida *in vitro* contra bacterias, levaduras y hongos (Baydar y col., 2004; Rivera-Carriles y col., 2005; Lee y col., 2005). En algunos casos se han correlacionado los cambios en el contenido y en el perfil de los ácidos fenólicos en el fruto con la susceptibilidad a patógenos. Se ha observado que la reducción en la concentración de ácido clorogénico y ácido cafeico en la epidermis de los melocotones (*Prunus persica*) se correlaciona con un incremento en la susceptibilidad al hongo *Monilinia fructicola* (Bostock y col., 1999). En la fresa los compuestos fenólicos disminuyen con la maduración y esta disminución se correlaciona con un aumento de la susceptibilidad a *B. cinerea* (Terry y col., 2004). El ácido caféico inhibe en medio líquido la producción de cutinasa en *B. cinerea* (Bostock y col., 1999). También se ha observado que el contenido en ácido caféico se correlaciona con la resistencia de diferentes clones de cebada al ataque por patógenos (Harrison y col., 2003). Se ha visto que la infección de kiwis (*A. chinensis*) por *B. cinerea* incrementa la concentración de compuestos fenólicos antifúngicos en el epicarpo. Tras la inoculación de las plantas de kiwi con *B. cinerea* se detectaron tres compuestos fenólicos, entre los que destacaba el ácido caféico, sugiriendo que forman parte de su sistema defensivo (Wurms, 2005). Utilizando elicitores se ha demostrado en hojas de tomate que una parte del sistema defensivo consiste en la inducción de la síntesis de compuestos fenólicos (Pearce y col., 1998). Recientemente se ha demostrado que el fruto de tomate acumula ácido vainillínico como parte de la defensa frente a la infección por *Alternaria alternata*. Los autores encontraron que la mezcla de ácido vainillínico con el ácido clorogénico

tiene un efecto inhibitorio sinérgico sobre la germinación de *Alternaria alternata* (Ruelas y col., 2006).

La camalexina es una fitoalexina implicada en la resistencia frente a diversos patógenos, puesto que los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en su síntesis (*phytoalexin deficient, pad*) son más susceptibles a diversos patógenos. Algunos de ellos son más susceptibles a *B. cinerea* y otros no (Ferrari y col., 2003; Thomma y col., 1999b).

Los flavonoides y estilbenos, también llamados polifenoles, se distinguen de los ácidos fenólicos en que su síntesis tiene su origen en un punto de bifurcación de la ruta de los fenilpropanoides. El trans-resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno) es una molécula sintetizada en las hojas de la uva en respuesta a varios estréses (Langcake & Price, 1976). Es una fitoalexina implicada tanto en los mecanismos de defensa constitutivos como inducibles de la planta. La síntesis de resveratrol juega un papel fundamental en los mecanismos de resistencia de las plantas contra infecciones fúngicas. El resveratrol es el compuesto estilbénico mayoritario identificado en los tejidos de la uva tras la infección por *B. cinerea* (Langcke, 1981) y se ha demostrado que se induce su acumulación como respuesta a la infección (Urena y col., 2003). La resistencia de la uva a la penetración de *B. cinerea* parece ser debida, en parte, a la rápida producción de resveratrol, su glucósido y varios compuestos derivados del resveratrol. Algunos de estos derivados, como el pterostilbeno y la ϵ -viniferina también son considerados fitoalexinas.

Los glucosinolatos son un amplio grupo de unos 100 compuestos que producen las plantas pertenecientes a la familia *Cruciferae* que tienen una actividad microbiana ya antiguamente bien documentada (Fenwick y col., 1983). La actividad antifúngica se ha demostrado para seis glucosinolatos, tanto *in vitro* (Mari y col., 1993) como *in vivo* (Mari y col., 1996a).

Defensas inducibles según el tipo de patógeno

En cada sistema las rutas de señalización mediadas por SA, JA y ET son utilizadas y reguladas de manera distinta, según el tipo de interacción planta-patógeno (Kunkel, 2002).

La denominada resistencia gen a gen es importante contra los patógenos que se clasifican como biótrosos (Glazebrook, 2005). La eficacia de este tipo de resistencia tiene un sentido intuitivo, puesto que la muerte de la primera célula infectada lograría parar el crecimiento del patógeno biótroso. Los estudios realizados sobre *P. parasitica* (Torres y col., 2002), *Erysiphe* spp. (Grant y col., 2003; Xiao y col., 2001) y *P. syringae* (Kunkel y col., 1993; Yu y col., 1993; Bisgrove y col., 1994; Debener y col., 1991; Hinsch & Staskawicz, 1996; Simonich & Innes, 1995) apoyan

esta idea. Para *P. parasitica* el factor de resistencia crítico es la muerte celular y no el estallido respiratorio (Feys y col., 2001; Torres y col., 2002), mientras que para *P. syringae* el factor crítico parece ser el potencial hídrico (Wright & Beattie, 2004) y no el estallido respiratorio (Torres y col., 2002). Esta resistencia está asociada a la ruta del salicílico y a la respuesta sistémica adquirida (SAR).

Como la señalización vía JA o ET y la del SA tienden a ser mutuamente inhibitorias, es de esperar que la ruta del JA o del ET tenga efectos deletéreos sobre la resistencia a los patógenos biótrofos.

Por otra parte, dada la estrategia de nutrición y crecimiento de los patógenos necrótrofos, la muerte de las células de la planta no sólo no limitaría su avance, sino que lo favorecería. Por tanto, en principio, no es esperable la presencia del modo de resistencia gen a gen en la interacción planta-necrótrofo, ni tampoco la señalización vía SA o el SAR y se esperaría que las rutas importantes en este tipo de interacciones fueran las mediadas por JA y ET (Glazebrook, 2005).

Aunque en *Arabidopsis* estas consideraciones sobre las distintas estrategias de defensa frente a biótrofos y necrótrofos parecen ser correctas en la mayoría de las interacciones planta-patógeno estudiadas (Glazebrook, 2005), algunos biótrofos incluyendo, *P. parasitica* y *Erysiphe* spp, evitan la activación de las defensas dependientes de JA o de ET, que podrían ser efectivas si fueran activadas. Así, el tratamiento de plantas de *Arabidopsis* con JA exógeno redujo el crecimiento de *Erysiphe cichoracearum* y este efecto requirió *COI1* (Zimmerli y col., 2004). Además, la mutación en *Arabidopsis* de la celulosa sintasa *CEV1*, que produce la activación de forma constitutiva de las rutas del JA y ET, confiere resistencia a *Erysiphe cichoracearum* (Ellis y col., 2002b). En el caso de *P. parasitica*, el análisis de dobles y triples mutantes puso de manifiesto que tanto la señalización vía SA, como la dependiente de JA o ET, era suficiente para conferir resistencia a este patógeno (Clarke y col., 2000). Por tanto, aunque es cierto que las defensas dependientes de JA o ET no parecen esenciales en este tipo de interacciones, la habilidad del patógeno para evitarlas también resulta importante. La camalexina no parece tener un papel en la resistencia, tanto en el caso de *Erysiphe ssp.* (Reuber y col., 1998) como de *P. parasitica* (Thomma y col., 1998a).

Por otra parte, los hongos necrótrofos *A. brassicicola* y *B. cinerea* son restringidos por las defensas dependientes de JA o de ET en *Arabidopsis* (van Wees y col., 2003; Thomma y col., 1998a). La camalexina contribuye a la resistencia frente a estos patógenos (Thomma y col., 1999 a y b, Ferrary y col., 2003), así como frente a otro necrótrofo, *Leptosphaeria maculans* (Bohman y col., 2004). No se ha observado resistencia gen a gen para este tipo de patógenos y en el caso de *B. cinerea* hay evidencias de que la muerte celular promueve el crecimiento del

patógeno (Govrin & Levine, 2000; Dickman y col., 2001). Sin embargo, aunque el SA no parece tener un papel principal en la resistencia a necrótrofos, sí tiene algún efecto sobre la resistencia a *B. cinerea* en *Arabidopsis* (Ferrary y col., 2003; Zimmerli y col., 2001), así como en tabaco (Sohn y col., 2007).

En el caso de la bacteria hemibiótrofa *P. syringae* los datos disponibles son, en cierta manera, contradictorios. La resistencia gen a gen es muy efectiva en contra de la bacteria (Debener y col., 1991; Kunkel y col., 1993; Yu y col., 1993; Simonich & Innes, 1995; Hinsch & Staskawicz, 1996). Sin embargo, el estallido respiratorio que se genera en este tipo de respuesta no parece tener un papel importante en la limitación del crecimiento bacteriano (Torres y col., 2002), pero sí las respuestas de defensa dependientes de SA, independientes de *NPR1*, ya que los mutantes defectivos en dicha ruta son más susceptibles a *P. syringae* con la excepción del mutante *npr1* (Clarke y col., 2000). La coronatina es un factor de virulencia que *P. syringae* secreta para inducir las rutas del JA/ET y aprovechar así el efecto antagónico de dicha ruta sobre la señalización vía SA (Bender y col., 1999). Por ello, el mutante insensible a coronatina, *coi1*, es también insensible al tratamiento con MeJA y resistente a *P. syringae* pv. *atropurpurea* (Feys, 1994). Sin embargo, se ha demostrado que la activación de forma constitutiva de la ruta del JA en las plantas *cev1* confiere resistencia a este patógeno (Ellis, 2002a).

El sentido evolutivo de que existan múltiples rutas de defensa en las plantas ha sido objeto de mucha discusión (Thomma, 2001). Disponer de rutas de señalización separadas puede permitir a las plantas modular finamente sus respuestas defensivas, para desplegar una combinación apropiada de defensas contra cada patógeno específico, según su estrategia de virulencia. De este modo, las mutuas interacciones antagónicas entre la ruta del SA y del JA asegurarían que no se activasen respuestas de defensas inapropiadas frente a determinados patógenos (Kunkel & Brooks, 2002). Por ejemplo, la ruta del SA promueve la muerte celular programada, por lo que es ventajoso evitar que se active en la planta frente a patógenos necrótrofos, que utilizan toxinas inductoras de la muerte celular como factores de virulencia (O'Donnell y col., 2001).

Mecanismos de defensa contra *Botrytis cinerea*

Como se ha introducido anteriormente, la resistencia a *Botrytis cinerea* en *Arabidopsis thaliana* depende de la señalización mediada por JA y de la producción de camalexina. En la tabla I.2 se muestran algunos mutantes de *Arabidopsis* para los que se ha testado su susceptibilidad a *B. cinerea* (Ferrary y col., 2003).

Las mutaciones que bloquean la ruta del JA, incluyendo *coi1* (Thomma y col., 1998) y *jar1* (Ferrari y col., 2003) aumentan la susceptibilidad de *Arabidopsis*. La

expresión de algunos genes de respuesta a JA está regulada por el factor de transcripción *JIN1*. Curiosamente, las plantas mutantes *jin1* son más resistentes a *Botrytis cinerea* (Lorenzo y col., 2004). Aparentemente, la señalización vía jasmónico lleva a la expresión de dos clases de genes: unos regulados por *JIN1*, que tienen un efecto neto negativo sobre la resistencia y otros no regulados por *JIN1*, que tienen un efecto neto positivo sobre la resistencia.

| Genotype ^a | Affected pathways ^b | Susceptibility ^c | References |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--|
| <i>nahG</i> | SA (accumulation) | + | This work; Govrin and Levine (2002) |
| <i>npr1-1</i> | SA (response) | = | This work; Thomma <i>et al.</i> (1998) ^d |
| <i>ein2-1</i> | Ethylene | + | This work; Thomma <i>et al.</i> (1999b) ^d |
| <i>etr1-1</i> | Ethylene | + | This work |
| <i>jar1-1</i> | JA | + | This work |
| <i>coi1-1</i> | JA | + | This work; Thomma <i>et al.</i> (1998) ^d |
| <i>npr1-1 jar1-1</i> | SA and JA | + | This work |
| <i>npr1-1 ein2-1</i> | SA and ethylene | ++ | This work |
| <i>ein2-1 jar1-1</i> | Ethylene and JA | ++ | This work |
| <i>npr1-1 ein2-1 jar1-1</i> | SA, ethylene and JA | ++ | This work |
| <i>eds4-1</i> | SA and/or ethylene ^e | + | This work |
| <i>eds5-1</i> | SA | = | This work |
| <i>eds8-1</i> | JA | + | This work |
| <i>sid2-2</i> | SA (biosynthesis) | = | This work |
| <i>pad2-1</i> | SA, camalexin biosynthesis | +++ | This work |
| <i>pad3-1</i> | Camalexin biosynthesis | ++ | This work |
| <i>pad4-1</i> | SA | = | This work |
| <i>eds1-2</i> | R gene-mediated resistance | = | This work |
| <i>ndr1-1</i> | R gene-mediated resistance | = | This work |
| <i>cpr1-1</i> | SA (constitutive) | - | This work |

The Plant Journal, (2003), 35, 193–205

Tabla I.2. Líneas isogénicas de *Arabidopsis* alteradas en alguna ruta de defensa y su susceptibilidad a *Botrytis cinerea*. Figura de Ferrari y colaboradores, 2003.

Todas estas observaciones han llevado a concluir que la activación de la ruta de señalización del JA es la responsable de conferir a las plantas una mayor resistencia a patógenos necrótrofos. Sin embargo, el aislamiento y caracterización del mutante *bos1* (*botrytis susceptible1*) constituye una excepción. *BOS1* codifica un factor de transcripción que se induce en la infección por *B. cinerea*. Su disrupción en el mutante *bos1* provoca la inducción constitutiva del gen *PDF1.2*. Sin embargo, el mutante presenta una elevada susceptibilidad a hongos necrótrofos (Mengiste y col., 2003).

Como ya se ha indicado, la producción de camalexina también contribuye a la resistencia, al menos a ciertas cepas de *Botrytis cinerea*, puesto que los mutantes *pad3* muestran una mayor susceptibilidad (Ferrari y col., 2003). Cabe destacar, sin embargo, que otro grupo de investigación que trabajaba con otra cepa no encontró una mayor susceptibilidad en las plantas *pad3* (Thomma y col., 1999a).

A diferencia de la estrategia de defensa frente a otros necrótrofos, como *A. brassicicola*, la resistencia a *B. cinerea* requiere la señalización dependiente de ET.

El bloqueo de la ruta del ET, causado por la mutación *ein2*, produce un aumento de la susceptibilidad (Thomma y col., 1999a; Ferrari y col., 2003). Además, la sobreexpresión del factor de transcripción *ERF1* aumenta la resistencia (Berrocal-Lobo y col., 2002). Parece como si los genes que tienen un papel importante en la resistencia a *Botrytis cinerea* se encuentran en un grupo coregulado por JA y ET y que *ERF1* active muchos de estos genes (Glazebrook, 2005).

Para un patógeno necrótrofo como este, se espera que la señalización dependiente de SA no contribuya a la resistencia. Las plantas mutantes *eds5*, *sid2*, *pad4* o *npr1* no exhiben una mayor susceptibilidad (Ferrari y col., 2003). Sin embargo, la aplicación de inhibidores de la PAL aumenta la susceptibilidad (Ferrari y col., 2003; Govrin & Levine, 2002). Es posible que la pequeña porción de ácido salicílico que es sintetizado a través de la PAL sea importante para limitar la propagación local de *Botrytis cinerea*. Por otra parte, el doble mutante *ein2-npr1* resultó más susceptible a *Botrytis* que *ein2*, lo que indica una implicación de la ruta del SA en la resistencia a *B. cinerea* (Ferrari y col., 2003). El mutante *enhanced disease susceptibility 4 (eds4)*, responde normalmente al SA exógeno a concentraciones altas, pero es insensible a concentraciones bajas y es más susceptible a *B. cinerea* (Gupta y col., 2000; Ferrari y col., 2003). Además el tratamiento con SA o con BTH (un análogo del ácido salicílico) también reduce el tamaño de la lesión (Ferrari y col., 2003; Zimmerli y col., 2001). Como hemos indicado anteriormente, *B. cinerea* tiene una fase inicial muy corta de biotrofismo en su ciclo vital en la cual es susceptible a los mecanismos de defensa mediados por SA.

Existen otros genes necesarios para la resistencia a *B. cinerea* que aún no están completamente estudiados. Entre ellos están incluidos *BOS1*, *BOS2*, *BOS4* y *ESA1* (Mengiste y col., 2003; Tierens y col., 2002; Veronese y col., 2004). *BOS1* codifica un factor de transcripción R2R3Myb (Mengiste y col., 2003). Además de comprometer la resistencia frente a los necrótrofos *B. cinerea* y a *A. brassicicola*, la mutación *bos1* reduce la tolerancia a la sequía, a la salinidad y al estrés oxidativo. *BOS1* podría actuar en la señalización dependiente de JA, puesto que su inducción por infección está bloqueada en los mutantes *coi1*. La mutación *bos3* reduce considerablemente la expresión de *PDF1.2*, reafirmando la idea de que un defecto en la ruta del ET/JA también aumenta la susceptibilidad a *B. cinerea* (Veronese y col., 2004). Los niveles de camalexina son más reducidos en el mutante *bos4*, además de ser más susceptible a *B. cinerea* y a *A. brassicicola*. Consistentemente, los mutantes *pad2 (phytoalexin deficient 2)*, en los que la inducción de camalexina se ve reducida, también son menos resistentes pero su susceptibilidad es más severa que la de los mutantes *pad3*, en los que la inducción de camalexina es

indetectable, lo que indica que ese fenotipo no se debe sólo a una reducción en los niveles de camalexina (Ferrari y col., 2003). Se cree que *ESA1* está implicado en la respuesta a ROS (Tierens y col., 2002). La mutación *esa1* también reduce la producción de camalexina y la expresión de *PDF1.2* y aumenta la susceptibilidad a *B. cinerea* y a *A. brassicicola* (Tierens y col., 2002). Al igual que las plantas *bos1*, los mutantes *esa1* son más sensibles al estrés oxidativo, sugiriendo una conexión entre la tolerancia al estrés oxidativo y la señalización dependiente de JA, por un lado y la resistencia a necrótrofos, por el otro.

B. cinerea podría promover la producción de ROS como mecanismo de virulencia para inducir una forma de respuesta hipersensible (HR) y así inducir la muerte celular (Govrin y col., 2000). Esta acumulación de ROS está relacionada con el gen *HSR203J* de tabaco. En el tejido infectado hay altos niveles de ROS y el aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno por adición de glucosa y de glucosa oxidasa, o por inhibición de la catalasa, resultó en un aumento del crecimiento de *B. cinerea*. Otros trabajos han apoyado esta idea. Al expresar genes animales antiapoptosis, para inhibir la HR en plantas de tabaco, aumentó la resistencia a *B. cinerea* (Dickman y col., 2001). La sensibilidad a los ROS de los mutantes *bos1* y *esa1*, que se ha tratado anteriormente, también apoya que la tolerancia a los ROS es importante en la resistencia a los hongos necrótrofos (Mengiste y col., 2003; Tierens y col., 2002). El gen de tomate *Ep5C* codifica una enzima de tipo peroxidasa, que se induce de forma muy rápida tras la aplicación de H_2O_2 , así como a las pocas horas tras la inoculación de *B. cinerea*, entre otros patógenos (Coego y col., 2005b). También se ha utilizado el promotor de este gen en *Arabidopsis* para buscar mutantes desregulados en su expresión (Coego y col., 2005a). Los autores encontraron el mutante recesivo *overexpressor of cationic peroxidase3* (*ocp3*). Las plantas *ocp3* en ausencia de patógeno muestran una mayor acumulación de H_2O_2 y sin embargo, son más resistentes a *B. cinerea*. La caracterización molecular del mutante desveló que *ocp3* posee expresión constitutiva de los genes *PDF1.2* y *GST-6* y que su resistencia es dependiente de JA. *OCP3* codifica un factor de transcripción cuya expresión se ve reprimida, tanto por la aplicación exógena de JA, como por la infección por hongos necrótrofos, por lo que los autores propusieron que *OCP3* actuaría como un represor de la respuesta a necrótrofos dependiente de JA (Coego y col., 2005a).

Respuestas sistémicas inducidas

Además de las defensas locales, las plantas han desarrollado un tipo de respuesta defensiva frente a subsiguientes ataques por patógenos, en otras partes de la planta alejadas de la zona de infección. La expresión de esta respuesta inducida no requiere la existencia de genes de resistencia específicos contra el patógeno, sino que se desarrolla mediante la activación de los mismos mecanismos generales de defensa ya descritos (Heath, 1998).

Resistencia sistémica adquirida (SAR)

Un tipo de resistencia inducida es la que adquiere la planta tras la infección por un patógeno avirulento necrotizante, y se le denomina resistencia sistémica adquirida (SAR) (Durrant & Dong, 2004). Este término fue acuñado por primera vez para describir la resistencia inducida en las hojas superiores de las plantas de tabaco, tras desarrollar lesiones necróticas en las hojas inferiores inoculadas con TMV (Ross, 1961). Diversos estudios pusieron de manifiesto que la SAR era un fenómeno independiente de la naturaleza del inóculo inicial (Mettraux y col., 2002), y que una vez activado, una interacción normalmente compatible podía convertirse en incompatible (Uknes y col., 1992; Mauch-Mani & Slusarenko, 1996). Inversamente, cuando se incapacita el desarrollo de la SAR, una interacción normalmente incompatible se vuelve compatible (Delaney y col., 1994; Mauch-Mani & Slusarenko, 1996). Se ha demostrado que esta respuesta es efectiva contra diversos hongos biótrofos y bacterias (Mettraux y col., 2002; Thomma y col., 1998a). En tabaco produce una considerable reducción de los síntomas de las enfermedades causadas por *Phytophthora parasitica*, *Cercospora nicotianae* y *Peronospora tabacina* (Vernooij y col., 1995) y no sólo confiere resistencia frente al TMV, sino también frente al virus de la necrosis del tabaco (TNV) y a las bacterias *P. syringae* pv. *Tabaci* y *Erwinia carotovora* (Vernooij y col., 1995). Por el contrario, la SAR no es efectiva contra *Botrytis cinerea* o *Alternaria alternata* (Ryals y col., 1996). El tabaco es el modelo mejor caracterizado de SAR, pero otras plantas responden de manera similar. En *Arabidopsis*, la SAR es efectiva contra *P. parasitica*, PstDC3000 y TCV y los genes inducidos son los mismos que en tabaco (Uknes y col., 1992). La SAR está mediada por el SA, puesto que el primer evento que se observa en su desarrollo es la acumulación de esta hormona, tanto a nivel local como sistémico. Sin embargo, se ha demostrado que el SA no es la señal móvil del SAR (Sticher y col., 1997). *DIR1* es un gen que codifica una proteína transportadora de lípidos localizada en el apoplasto, que es necesaria para la

inducción de esta respuesta y se ha sugerido que interaccionaría con un derivado lipídico, lo que permitiría una señalización a larga distancia del SAR (Maldonado y col., 2002). Además, el receptor de SA en tabaco, SABP2, es una lipasa cuya actividad es estimulada por la unión de SA, lo que podría generar esa señal lipídica (Kumar & Klessig, 2003). Por otra parte, la proteína SFD1 (*supressor of fatty acid desaturase deficiency 1*), que es requerida para la SAR, parece estar implicada también en el metabolismo de lípidos (Nandi y col., 2004). Estas observaciones apuntan a que los derivados lipídicos son importantes componentes de la señalización a larga distancia en la SAR.

Recientemente hay autores que han sugerido que el JA juega un papel en el establecimiento de la SAR (Truman y col., 2007). En este estudio se demuestra que es necesaria una rápida inducción de genes de biosíntesis y de respuesta a JA en el tejido sistémico para el desarrollo de la SAR contra PstDC3000 en *Arabidopsis*. Estos estudios postulan nuevamente una interacción sinérgica entre las rutas del SA y del JA.

Resistencia sistémica inducida (ISR)

Otro tipo de resistencia inducida es la producida por bacterias no patógenas, que son rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), denominada resistencia sistémica inducida (ISR). En contraste con la SAR, la ISR es efectiva contra necrótrofos y se caracteriza por su dependencia de las hormonas JA y ET (Pieterse & Van Loon, 1999; Pieterse & Van Loon, 2004; Ahn y col., 2007). En *Arabidopsis* resulta de la interacción con la bacteria no patogénica *Pseudomonas fluorescens* WCS417r y está mediada por JA y ET (Pieterse y col., 1996 y 1998; Thomma y col., 1998a). En tomate la ISR protege contra diversos patógenos (Duijff y col., 1998) y puede ser producida por *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2, que induce resistencia a *B. cinerea* (Audenaert y col., 2002a).

Así como la acumulación de PRs es el sello distintivo de SAR, no se han detectado proteínas relacionadas con la defensa en las plantas que desarrollan ISR. Sin embargo, en ambos casos tras la inoculación con el patógeno, se produce una mayor y más rápida expresión de genes relacionados con la defensa, fenómeno descrito como cebado o *priming* (Van Loon y col., 2006a).

SAR e ISR tienen elementos reguladores en común, puesto que el establecimiento de ambos estados está bloqueado en el mutante *npr1*, que originariamente fue descrito como regulador clave de SAR. La activación de *NPR1* conduce a la expresión de genes *PR* en SAR, algo que no sucede en ISR (Cao y col., 1994; Pieterse y col., 1998). *NPR1* es capaz de regular diferencialmente tanto ISR como

SAR, dependiendo de la ruta activada. En la figura I.12 se muestra un esquema de las interrelaciones entre ambos tipos de resistencias inducidas en *Arabidopsis*.

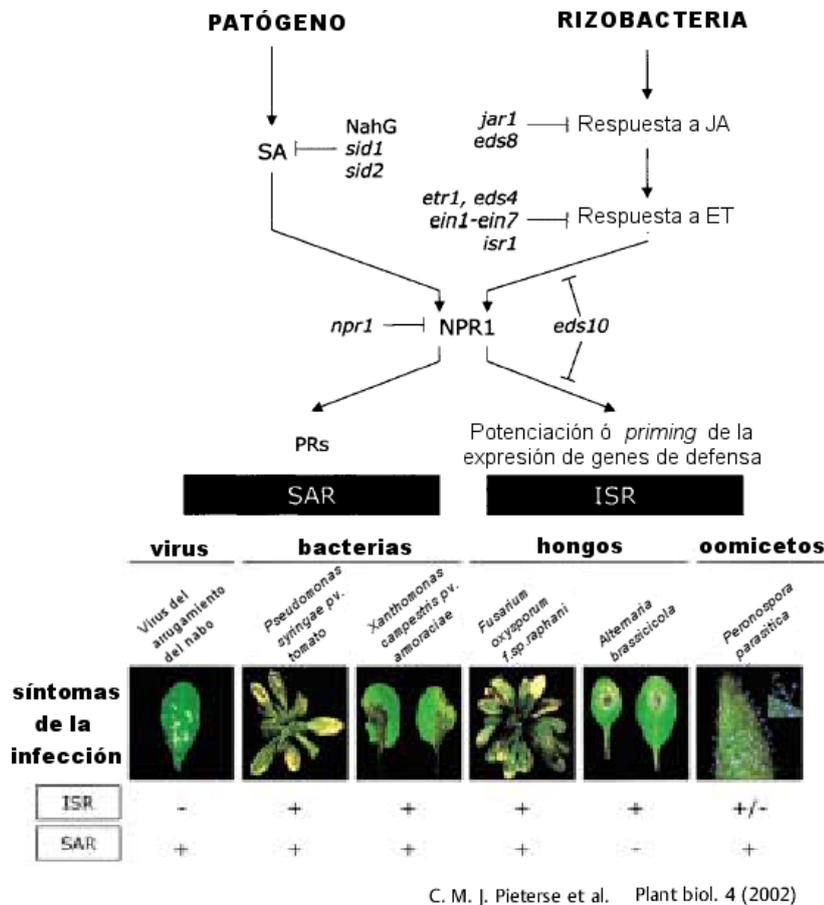


Figura I.12. Esquema de las interrelaciones que existen entre la SAR y la ISR en *Arabidopsis* y la efectividad de cada tipo de resistencia contra varios tipos de patógenos de plantas. Figura adaptada de Pieterse y colaboradores, 2002.

Resistencia inducida por herida (WIR)

Entre los tipos de respuesta sistémica caracterizados se encuentra la resistencia inducida por herida (WIR), típicamente asociada al daño producido por insectos herbívoros al alimentarse de la planta (Gatehouse, 2002; Howe, 2004). Green y Ryan (1972) mostraron por primera vez que las heridas inflingidas en hojas de tomate y de patata producían una expresión sistémica de inhibidores de proteasas (PIs), que bloqueaban la actividad de las enzimas digestivas del intestino medio de los insectos herbívoros (Green & Ryan, 1972). Entre las señales implicadas en la activación de esta ruta en tomate está la sistemina, que es un péptido de 18 aminoácidos derivado de la lisis de la prosistemina. Ésta y otras señales activan la

expresión de un PI, a través de la ruta de la síntesis de JA. La sistemina se une a un receptor quinasa de la superficie celular, SR160, que además funciona como un receptor de los brasinosteroides (Scheer & Ryan, 2002; Montolla y col, 2002). La transducción de esta señal en la activación de la síntesis de JA aún es desconocida. Una posibilidad es que la sistemina sea translocada desde el sitio de la herida a las hojas distales y allí active la ruta de los octadecanoides y la expresión de PI. Otro modelo postula que la sistemina actuaría localmente en el sitio de la herida para elicitar la producción de JA, que sería la señal móvil para la expresión de PI. Los resultados obtenidos con el mutante *jai1* apoyan el segundo modelo (Ryan & Moura, 2002). El actual repertorio de mutantes deficientes en la respuesta a herida se pueden clasificar en: mutantes deficientes en la síntesis de JA, en la percepción de JA o en la función de la sistemina (ver tabla I.3).

| Biochemical process | Name ^a | Mutation ^b | Gene product | <i>Arabidopsis</i> ortholog | References(s) |
|---------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------|
| JA biosynthesis | <i>def1</i> | EMS | Unknown | Unknown | [4,16] |
| | <i>acx1</i> | EMS | Acyl-CoA oxidase | ACX1, ACX5 | [27**] |
| | <i>aoc</i> | AS | Allene oxide cyclase | AOC (four isoforms) | [17] |
| | <i>spr2</i> | EMS | ω -3 fatty acid desaturase | FAD7, FAD8 | [4,15] |
| JA signaling | <i>jai1</i> | FN | COI1, F-box protein | COI1 | [14*] |
| Systemin production | <i>Prosys</i> | AS | Prosystemin | None | [6] |
| | <i>Prosys</i> | OE | Prosystemin | None | [6] |
| Systemin signaling | <i>spr1</i> | EMS | Unknown | Unknown | [37] |
| ROS production | <i>Rboh</i> | AS | NADPH oxidase | RbohD, RbohF | [23] |

Abbreviations: *aoc*, allene oxide cyclase; FAD, ω -3 FATTY ACID DESATURASE; *Rboh*, Respiratory burst oxidase homolog.
^a Not listed are various wound response mutants that are deficient in abscisic acid and ethylene biosynthesis.
^b Mutations induced by ethylmethane sulfonate (EMS), fast-neutron bombardment (FN), 'antisense' cDNA expression (AS), or 'sense' cDNA overexpression (OE).

Current Opinion in Plant Biology 2005, 8:369-377

Tabla I.3. Mutantes de tomate deficientes en WIR. Figura de Schillmiller & Howe, 2005.

De los estudios genéticos realizados con estos mutantes se evidencia que la herida y la sistemina activan la expresión de PI a través de una ruta de señalización común que requiere JA y que los jasmonatos son los componentes cruciales en la señal móvil (Howe, 2004). El tomate también ha sido ampliamente utilizado como modelo. En la figura I.13 se muestra un modelo propuesto para WIR (Schillmiller & Howe, 2005).

El tejido dañado por herida mecánica o por el ataque de insectos activa la síntesis de JA a partir del ácido linoleico. La ruta de los jasmonatos está regulada, como ya se ha descrito previamente, tanto por señales directas como indirectas, que se producen en el frente del tejido donde se está alimentando el insecto, incluyendo sistemina (Ryan, 2000), OGAs, ET, ABA, ROS, NO y conjugados de ácidos grasos con aminoácidos derivados del insecto (FACs). Estas señales pueden producir un efecto positivo o negativo sobre la ruta. Algunas señales promueven efectos

opuestos sobre diferentes plantas. Por ejemplo, los OGAs y el ET promueven las respuestas a herida en tomate, pero inhiben ciertas respuestas a herida en *Arabidopsis*. Hay que destacar la existencia de una ruta independiente de JA en respuesta a herida (Leon y col., 2001; Howe, 2004). Las señales de herida que regulan la expresión de estos genes independientes de JA y *COI1* (figura I.13, en rojo) aún son desconocidas y se sabe muy poco de la función fisiológica de esta ruta, pero parece que algunas de estas respuestas son promovidas por señales físicas (Malone, 1996; Stratmann & Ryan, 1997).

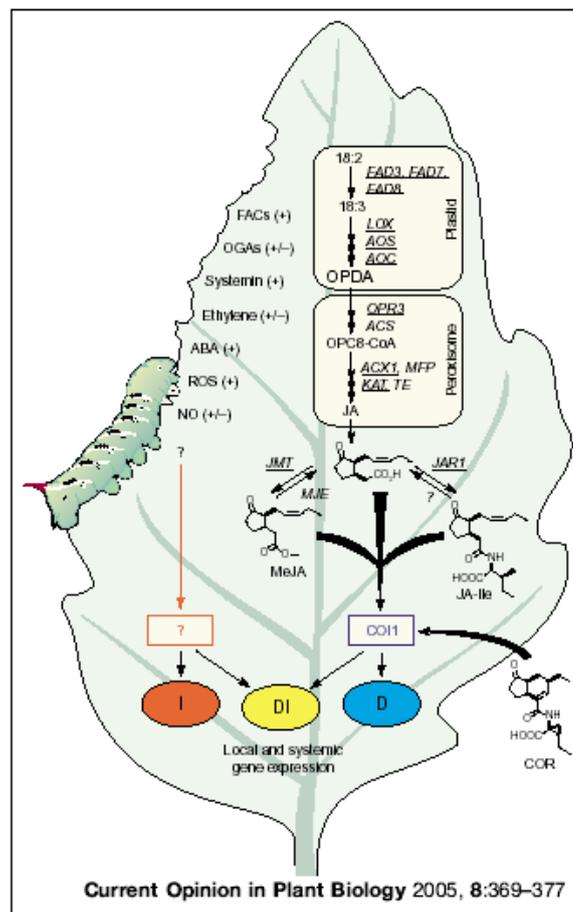


Figura I.13. Modelo general de inducción de los genes de respuesta a herida. Figura de Schillmiller & Howe, 2005.

Recientemente se ha descubierto que el mutante deficiente en JA *acx1* de tomate, es deficiente en una Acil-CoA oxidasa (ACX1A), que cataliza el primer paso en la etapa de β -oxidación en la ruta de los octadecanoides (Li y col., 2005). La mayor susceptibilidad de las plantas *acx1* frente a la oruga del tabaco *Manduca sexta*, indica que el JA o alguno de sus derivados, es la señal crucial para la resistencia inducida a insectos herbívoros. Otros experimentos con injertos en las plantas *acx1*

demonstraron que el factor que genera la señal sistémica o la señal sistémica en sí, es un producto de la espiral de β -oxidación. Estas observaciones apoyan una implicación de los peroxisomas en la producción de moléculas señalizadoras con base lipídica que promueven la respuesta de defensa sistémica. Teniendo en cuenta todos estos datos surge la posibilidad de que el estrés biótico pueda ser un estímulo general para la proliferación de peroxisomas, los cuales estarían implicados en la inmunidad sistémica (Cruz Castillo y col., 2004; Schenk y col., 2003; Lopez-Huertas y col., 2000).

Factores que influyen en la resistencia inducida

Dado que la resistencia inducida se basa en la respuesta de la planta, también puede estar influida por el ambiente y por el genotipo de la misma. En *Arabidopsis* se han observado diferencias en la elicitación de la ISR según el ecotipo estudiado (Ton y col., 1999; Van Wees y col., 1997). Asimismo, se ha propuesto que la exposición de las plantas a estreses abióticos puede influir en su resistencia a patógenos (Ayres, 1980). Por una parte se observó que el estrés hídrico aumentaba la susceptibilidad a patógenos foliares (Oerke y col., 1992). Sin embargo, se había observado que el crecimiento en suelos secos confería resistencia al oidio producido por *Erysiphe graminis* en cebada (Ayres & Woolacott, 1980). Otros autores encontraron que el alivio del estrés hídrico llevaba al inicio de la resistencia a *Erysiphe graminis* por el gen *Mlo* en cebada de primavera (Newton & Young, 1996; Baker y col., 1998). La resistencia basada en el gen *Mlo* consiste en una resistencia a la penetración del hongo, que se cree asociada con una rápida acumulación de calosa en la papila que se forma debajo del apresorio del hongo (Skou, 1982). Más recientemente, Wiese y colaboradores (2004) mostraron que el estrés osmótico puede llevar a la inducción de defensas activas contra *Blumeria graminis* en cebada. La activación de las defensas resultó ser dependiente de la intensidad del estrés y el mecanismo de contención del patógeno era por formación de papilas. El resultado más interesante fue que la resistencia era igualmente dependiente de la concentración de ácido abscísico (ABA) aplicado por la raíz. Estas observaciones demostraron que la resistencia de la planta puede ser influida por estreses abióticos. Como ya se ha descrito en los apartados anteriores, otras evidencias más recientes han implicado a la hormona ABA directamente en la defensa de las plantas frente a patógenos (Mauch-Mani & Mauch, 2005) y han puesto de manifiesto el papel regulador del ABA entre las rutas dependientes de SA y JA (Flors y col., 2008). Todo ello ha despertado un gran interés por el estudio de la interrelación entre estrésemos bióticos y abióticos (Anderson y col., 2004; Fujita y

col., 2006). Una explicación evolutiva para que todos estos mecanismos de defensa sean inducibles, en lugar de expresarse constitutivamente, es que conllevan costes para las plantas, ya que requieren la translocación de recursos limitados, afectando a su crecimiento y reproducción (Bostock, 2005). De hecho, hay evidencias experimentales de este supuesto, ya que se ha demostrado que en ausencia de patógenos, las plantas de *Nicotiana attenuata* tratadas con JA producen menos semillas. En cambio, bajo presión moderada de herbívoros, el tratamiento resulta beneficioso (Baldwin, 1998). Por otra parte, la expresión constitutiva de inhibidores de proteasas en estas mismas plantas también afecta al bienestar de la planta (Zavala y col., 2004).

ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE FITOPATOLOGÍAS FÚNGICAS

El control de fitopatologías fúngicas se ha basado tradicionalmente en el uso de compuestos fungicidas. En los últimos años se ha comenzado a trabajar en la aplicación de técnicas próximas a la lucha integrada, que sean respetuosas con el medio ambiente y reduzcan el uso de productos químicos, entre las que cabe destacar la biotecnología aplicada a cultivos (Lamb, 1992), el uso de antagonistas biológicos (Janisiewicz, 1995), la inducción de las defensas naturales de las plantas con compuestos naturales biodegradables (Lyon, 1995; Elgaouth y col., 1992 a y b) y el uso de compuestos de baja toxicidad con capacidad antimicrobiana (Osbourn, 1996). El capítulo segundo de la presente tesis tratará aspectos relacionados con las dos últimas estrategias. A continuación se describirán los fungicidas que se han usado para el control de *B. cinerea*, así como algunos ejemplos de biotecnología aplicada y de antagonistas biológicos utilizados.

Historia del control químico de *Botrytis cinerea*

Ya los romanos utilizaban sulfuro para controlar este patógeno en sus viñas mientras que en Alemania se recomendó el uso de sulfuro y potasio por primera vez en 1793 (Rosslénbroich & Stuebler, 2000).

Ya en el siglo XX el control de *B. cinerea* se basaba en el uso de dicarboximidazoles y benzimidazoles. Los benzimidazoles son inhibidores de la formación de microtúbulos (Yarden & Katan, 1993). Los benzimidazoles carbendazima o MBC, el benomilo y el metil-tiofanato fueron introducidos a principios de los años ochenta en muchas viñas europeas para controlar la podredumbre gris. Estos compuestos

no afectan a la germinación de las esporas de *B. cinerea*, pero inhiben la elongación del tubo germinativo y el crecimiento del micelio a bajas concentraciones (Leroux y col., 1998). Se detectaron dos fenotipos de resistencia a los benzimidazoles en las poblaciones de *B. cinerea* en las viñas francesas (Leroux y col., 1998; Leroux & Chapeland, 1999; Faretra & Pollastro, 1991). Las dicarboximidazoles afectan a la osmorregulación, causan permeabilización celular y peroxidación lipídica (Latorre y col., 1994; Lee y col., 1998). Las dicarboximidazoles clozolinato, iprodiona, procimidona y vinclozolina se caracterizan por la presencia de un grupo 3,5-diclorofenilo y desbancaron a los benzimidazoles entre finales de los ochenta y principios de los noventa, pero su uso intensivo llevó a la aparición de resistencias (Leroux y col., 1998 y 1999). El benomilo, el clozolinato y la vinclozolina han sido excluidos de la lista de sustancias activas aceptadas para su uso fitosanitario (Anexo I de la Directiva 91/414/CEE (246),13 de Diciembre de 2007).

Después, los fungicidas utilizados en viñas contra *B. cinerea* fueron el tiram (ditiocarbamato), el captan, la diclofluanida, el folpet (derivados del clorometilmercaptano) y el clortalonil (ftalonitrilo). Su acción preventiva es debida a su capacidad de inhibir la germinación, que está relacionanda con el bloqueo de varios enzimas implicados en la germinación con grupos tioles en su estructura. Sin embargo, su uso práctico fué restringido porque resultaban débiles botricidas y podían retrasar la fermentación del mosto (Leroux y col., 2002). Además, aparecieron resistencias, sobre todo a la diclofluanida, en varios países de Europa (Rewal y col., 1991; Pollastro y col., 1996). La diclofluanida ha sido excluida de la lista de sustancias activas aceptadas para su uso fitosanitario (Anexo I de la Directiva 91/414/CEE (246),13 de Diciembre de 2007).

A partir de 1990 llegaron al mercado nuevos botricidas con diferentes modos de acción, que suponían opciones efectivas para el control de *B. cinerea* y para evitar la aparición de resistencias (Rosslenbroich & Stuebler, 2000).

Un grupo de estos botricidas son las anilino pirimidinas ciprodinil, pirimetanil, y mepanipirim (recientemente introducida en la lista de sustancias activas aceptadas para su uso fitosanitario). Son fungicidas que inhiben la síntesis de metionina (Masner y col., 1994; Fritz y col., 1997). Los tres son efectivos contra varios ascomicetos y adelomicetos. Fueron introducidos en varios países europeos a mitad de la última década del siglo XX. El pirimetanil y el mepanipirim son especialmente activos contra *B. cinerea* (Masner y col., 1994; Fritz y col., 1997). Otra cualidad común en las anilino pirimidinas es la capacidad de inhibir la secreción de enzimas hidrolíticas fúngicas (celulasas, cutinasas, lipasas, proteasas) implicadas en el proceso de infección (Miura y col., 1994; Milling & Richardson, 1995). Los estudios *in vitro* realizados en medio mínimo mostraron que las anilino pirimidinas no afectan

a la germinación de las esporas de *B. cinerea*, pero inhiben la elongación del tubo germinativo y el crecimiento inicial del micelio a bajas concentraciones. Por ello poseen actividad protectora y curativa. En medio completo la respuesta era variable debido a la capacidad del hongo para obtener nutrientes que le permitían sortear el modo de acción de las anilino pirimidinas. El estudio de seguimiento de la aparición de cepas resistentes llevado a cabo en viñas francesas desde 1994 encontró tres fenotipos de resistencia entre los aislados de *B. cinerea* (Leroux & Chapeland, 1999).

Otros fungicidas utilizados en el control de *B. cinerea* son el fenpiclonil y el fludioxonil, pertenecientes al grupo de los fenilpirroles, que son derivados del antibiótico pirrolnitrina, el cual es producido por algunas especies de *Pseudomonas* sp. El espectro de actividad antifúngica de los fenilpirroles es similar al de las dicarboximidias. El efecto antagonista del α -tocoferol sobre el efecto del fenpiclonil en *B. cinerea* sugiere que este fungicida estimula la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), induciendo la peroxidación (Leroux y col., 1992). El fludioxonil es un fungicida no sistémico que se ha utilizado en las viñas francesas desde 1995. Inhibe la germinación, la elongación del tubo germinativo y el crecimiento del micelio de *B. cinerea*. Se comercializa mezclado con la anilino pirimidina ciprodinil (COMPO, Syngenta Crop protection AG, Suiza).

También están los fungicidas hidrocarbonados aromáticos (AHF). El diclorano es especialmente efectivo contra *B. cinerea* en lechuga y en frutos almacenados, pero también se han detectado resistencias (Leroux y col., 1999). La hidroxianilida fenhexamida pertenece al grupo de fungicidas inhibidores de la síntesis de esteroides (SBI) y es la más efectiva contra *B. cinerea*. La fenhexamida fué introducida a finales del siglo XX (Rosslenbroich & Stuebler, 2000). La fenhexamida, al igual que ocurre con otros SBIs, inhibe la germinación de las esporas tan sólo a concentraciones relativamente altas. Sin embargo, es un eficaz inhibidor de todos los demás estados de desarrollo de *B. cinerea*. Poco después del inicio de la germinación, el tubo germinativo de las esporas tratadas para de crecer y éstas muestran estructuras granulosas en el citoplasma, como uno de los primeros síntomas visibles (Pontzen & Scheinpflug, 1989). El citoplasma entonces empieza a coagularse y a retraerse. Las esporas y los tubos germinativos se colapsan y mueren antes de penetrar en la superficie de la planta. Las esporas germinadas y tratadas con fenhexamida muestran una excreción anormal, que se supone material citoplasmático o derivado de la pared celular del hongo. Estas observaciones sugieren que la fenhexamida afecta a la integridad y a la funcionalidad de la membrana plasmática o de la pared celular (Rosslenbroich & Stuebler, 2000). Otros inhibidores de la síntesis de esteroides utilizados en agricultura contra *B. cinerea* son

el procloraz y algunos derivados de los triazoles, como el tebuconazol. Ya se han encontrado cepas de *B. cinerea* resistentes a fungicidas inhibidores de la síntesis de esteroides en varios países (Elad y col., 1992). También se han encontrado fenotipos de resistencia a fenhexamida *in vitro* en poblaciones de *B. cinerea* aisladas de cultivos (Chapeland y col., 1999; Leroux y col., 2002).

Tanto las dicarboximidazoles como los fenilpirroles y los AHFs más tóxicos, inhiben la germinación y el crecimiento del micelio de *B. cinerea*, siendo más eficaces en el segundo proceso. Además producen alteraciones del tubo germinativo similares (hinchamiento, plasmolisis, ramificaciones). Inducen peroxidación lipídica, la lisis de la membrana y otros efectos tóxicos que podrían estar relacionados con la formación de ROS (Leroux y col., 1992). Se cree que estos fungicidas son los únicos compuestos comerciales que actúan sobre los patógenos de plantas mediante la inhibición de una proteína quinasa (Ochiai y col., 2001; Oshima y col., 2002).

El fluazinam es una fenilpirimidina y un fungicida de amplio espectro. Es altamente tóxico para las esporas y el micelio de *B. cinerea* y su mecanismo de acción está relacionado con el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Guo y col., 1991). El fluazinam se ha utilizado en Japón desde 1990 contra la podredumbre gris en diversos cultivos aunque fue introducido en las viñas francesas en 1999. En Japón aparecieron cepas de *B. cinerea* resistentes (Tamura y col., 2000).

Muchas estrobilurinas como la azoxistrobin y la metominstrobin han podido controlar las podredumbres causadas por *B. cinerea* en varios cultivos, incluidas verduras, plantas ornamentales y fresa (Dacol y col., 1998). Sin embargo, en algunas situaciones, especialmente sobre uva, su eficacia no fue satisfactoria.

En conclusión, el control de este patógeno es particularmente difícil y ha sido basado tradicionalmente en el uso de fungicidas comerciales, lo que ha llevado a la aparición de cepas resistentes (Leroux y col., 2002), además de contribuir a la contaminación de los suelos y de las aguas (Knight y col., 1997). El desarrollo de resistencias a los fungicidas químicos, la falta de sustitutos adecuados, y el creciente interés social sobre los peligros ambientales y de salud que tienen estos pesticidas, han generado un gran interés en el desarrollo de métodos de control alternativos, que sean menos tóxicos y más favorables ambientalmente. Además, el estricto control sobre la utilización de productos fitosanitarios convencionales, generado por la aplicación de la Directiva 91/414/EC, ha derivado en una necesidad de ofertar alternativas para la protección vegetal de bajo impacto ambiental. Los plaguicidas actualmente registrados están siendo revisados por la Comisión de la Unión Europea. Este proceso conducirá, con toda probabilidad, a la prohibición de

numerosas sustancias activas, usadas habitualmente (Montesinos y col., 2003). Por ello es importante buscar nuevos compuestos con propiedades antifúngicas potentes pero no tóxicas y/o compuestos que puedan ofrecer una alternativa a los clásicos fungicidas para el control de *B. cinerea* y de otras fitopatologías en general.

Biotecnología aplicada a cultivos

Quizá el ejemplo más conocido y extendido de biotecnología aplicada a cultivos sea el maíz BT. El maíz BT es aquel en el que se ha introducido un gen de *Bacillus thuringiensis*, una bacteria naturalmente presente en el suelo. El gen codifica una toxina muy eficaz y selectiva contra las larvas de lepidópteros. Esta proteína se denomina la endotoxina delta Bt. Esta toxina (Cry1Ab), no afecta a otros órdenes de artrópodos y se considera segura para el resto de los animales y para el medio ambiente. El maíz Bt fue el primer cultivo genéticamente modificado producido en España, que comenzó en 1998 (Alcalde & Cámara, 2007). En los años 90, el énfasis en las estrategias de control de fitopatologías fúngicas apuntaba a las plantas transgénicas que contuviesen compuestos antifúngicos de origen heterólogo (Hain y col., 1993). Sin embargo, los patógenos necrótrofos tales como *B. cinerea* están bien adaptados a sobrevivir en un ambiente hostil lleno de compuestos antifúngicos (Quidde y col., 1998; de Waard, 2006). Por otra parte, hay que destacar que la producción comercial de organismos modificados genéticamente tiene diversas dificultades legislativas y sociales en la Unión Europea. A nivel de investigación existen varios ejemplos de la aplicación de la biotecnología a cultivos para mejorar su resistencia a patógenos. Las proteínas RAR1 y SGT1 funcionan sinérgicamente o antagónicamente en la respuesta innata de la planta. La sobreexpresión de *OsRar1* y *OsSGT1* en arroz incrementó la resistencia basal a *Xanthomonas oryzae*, aunque dicha resistencia era específica de raza en cuanto al patógeno (Wang y col., 2008). Por otra parte, se ha introducido el gen de la oxalato oxidasa (*OxO*) de trigo en chopo, tabaco, soja y girasol. La OxO derivatiza el ácido oxálico producido por patógenos fúngicos, por lo que confiere resistencia en estas plantas a estos patógenos (Berna & Bernier, 1997; Liang y col., 2001; Hu y col., 2003). Similarmente, la sobreexpresión de la oxalato descarboxilasa en tomate, tabaco o lechuga les confirió resistencia a *Sclerotinia sclerotiorum* (Kesarwani y col., 2000; Dias y col., 2006). Se ha intentado frenar la podredumbre gris por medio de la biotecnología en tomate (Powell y col., 2000) y en vid (Agüero y col., 2005) construyendo plantas transgénicas que expresen proteínas inhibidoras de las poligalacturonasas fúngicas. Esta estrategia ha tenido un éxito parcial, aunque la

deleción de una β -1,4-xilanasa retrasó la formación de la necrosis y la redujo más de un 70% (Brito y col., 2006). Muy recientemente se ha introducido el cDNA de la OxO de trigo en plantas de tomate, confiriéndoles más resistencia a *B. cinerea* (Walz y col., 2008).

Control biológico

A final del siglo XX los microorganismos con capacidad de ser efectivos contra fitopatologías y patologías postcosecha ganaron considerable atención (Sugar & Spotts, 1999). Estos antagonistas pueden ser bacterias levaduras y hongos. El mecanismo común de biocontrol parece ser la competición por los nutrientes y el espacio (Mari y col., 1996b), pero otros mecanismos implican la producción de metabolitos antifúngicos (Janisiewicz y col., 1991), el parasitismo o una resistencia inducida, a veces asociada a una inhibición de la actividad enzimática del patógeno (Benhamou & Chet, 1996). El uso de bacterias no productoras de antibióticos y de levaduras parece prometedor. Los productos comerciales "Aspire" y "Bio-save" (USA) son formulados biológicos que contienen la levadura *Candida oleophila* y una cepa saprófita de *P. syringae*, respectivamente (Janisiewicz & Marchi, 1992). Janisiewicz & Jeffers (1997) encontraron que una preparación fresca de *P. syringae* confería resistencia a las manzanas frente a *P. expansum* y *B. cinerea*.

Una de las principales limitaciones del control biológico es el estrecho margen de condiciones ambientales en que pueden sobrevivir y actuar de forma eficaz los microorganismos, por el simple hecho de ser seres vivos. Esta limitación se acentúa en condiciones de campo y durante la formulación y conservación de estos productos biológicos. La formulación de los agentes de biocontrol difiere de la de los productos químicos en que, en los primeros, estamos hablando de microorganismos vivos, y durante el proceso de formulación se han de garantizar las condiciones necesarias para mantener su viabilidad, así como también durante toda la vida útil del producto. El trabajo con seres vivos implica un gran número de problemas técnicos que pueden conducir a la pérdida de viabilidad, inactivación e incluso muerte, si las condiciones son adversas. Sin embargo, el uso del control biológico puede mostrar mayores ventajas respecto a las sustancias sintéticas, ya que al tratarse de microorganismos que normalmente han sido aislados del propio hospedador, o del entorno donde posteriormente se aplican, es de esperar que su impacto ambiental sea inferior al que puede producir un fungicida de síntesis. Un producto formulado ha de presentar una vida útil suficientemente larga para que pueda ser manipulado, al menos a lo largo de la campaña de la fruta a proteger. Seis meses de vida útil se considera el mínimo tiempo aconsejable a conseguir y un

año en el caso de microorganismos es un resultado excelente. El empleo de microorganismos para contrarrestar el efecto de los patógenos de postcosecha se puede cuestionar por el impacto que puede tener su aplicación en el ecosistema existente. Su aplicación disminuye la población del patógeno diana, pero también podría alterar las poblaciones microbianas allí presentes.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL SISTEMA TOMATE- *BOTRYTIS CINEREA*

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. España es el séptimo país productor con una producción anual de 3.600.000 toneladas (fuente: FAO, datos del 2002) y exporta a numerosos países de América del Norte, África y Europa, aunque mayoritariamente a Reino Unido, Francia, Alemania y Holanda (FAO, datos del 2004). Según la Consellería de Agricultura y Pesca sólo en la Comunidad Valenciana tiene una producción de 121.245 toneladas (datos del 2005). Según el Ministerio de Agricultura y Pesca se dedica casi un 4% de la superficie de la Comunidad Valenciana al cultivo de hortalizas y un 0.025% de la superficie total cultivada (Datos del verano del 2005). Las variedades cultivadas suelen estar en monocultivos genéticamente uniformes localizados en amplias áreas de terreno, lo cual facilita el desarrollo de epidemias que disminuyen el rendimiento, la calidad y la seguridad de la cosecha. Así, se estima que las pérdidas de rendimiento por causas debidas a patógenos están alrededor del 10-20% (Kreps y col., 2002).

Entre las enfermedades que afectan al cultivo de tomate una de las más frecuentes y difíciles de controlar es la causada por el hongo necrótrofo *B. cinerea*. Es un patógeno que ataca a un amplio número de especies vegetales, afectando a todos los cultivos hortícolas, pudiéndose comportar como parásito y saprófito. En plántulas produce marchitamiento. En hojas y flores se producen lesiones pardas. En frutos tiene lugar una podredumbre blanda (más o menos acuosa, según el tejido), en la que se observa el micelio gris del hongo. *B. cinerea* es el clásico patógeno de alto riesgo en cuanto a la aparición de resistencias (Brent & Hollomon, 1998). Debido a sus condiciones climáticas, los cultivos en invernadero son más susceptibles al ataque por este patógeno. En este sentido, el riesgo de podredumbres por *B. cinerea* es más alto en España, Italia, Turquía, Corea del Sur y Japón (Rosslénbroich & Stuebler, 2000). El control efectivo de *B. cinerea* a menudo requiere el uso de muchos tratamientos químicos, con resultados muchas veces insatisfactorios (Faretra & Pollastro, 1991; LaMondia & Douglas, 1997; Leroux, 1996).

Por otra parte, cabe destacar el interés del sistema tomate-*B. cinerea* como modelo experimental y existe un proyecto internacional para la secuenciación completa del genoma de *Solanum lycopersicum* (<http://www.sgn.cornell.edu/>) y ya hay disponible un banco de secuencias (NCBI). Cada vez hay más mutantes de tomate en las rutas conocidas de defensa disponibles para su uso en el estudio de la interacción planta-patógeno, así como herramientas para la obtención de nuevos mutantes o de plantas modificadas genéticamente para la expresión o sobreexpresión de genes. Por otra parte, *B. cinerea* es un patógeno necrótrofo estricto capaz de infectar más de 200 especies vegetales. La obtención de mutantes y el desarrollo de herramientas genéticas y moleculares para *B. cinerea* (Rolland y col., 2003; Tudzynski & Siewers, 2004), así como la disponibilidad de un banco de ESTs (Viaud y col., 2005) y la reciente secuenciación de dos cepas de *B. cinerea*, (<http://www.broad.mit.edu/>) y (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) han animado a muchos investigadores a trabajar con este patógeno y como resultado, ha emergido como un modelo de patógeno necrótrofo.

OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS

Como ya se ha indicado en la introducción, la aplicación de fungicidas sintéticos es una práctica habitual en la lucha contra las enfermedades en frutos y vegetales durante su cultivo y almacenamiento post-cosecha (Knigh y col., 1997). Sin embargo, han aparecido resistencias entre las poblaciones de hongos, lo que conlleva una pérdida de la efectividad de los tratamientos. Además, los problemas relacionados con la incidencia negativa en la salud pública y el medio ambiente de estos productos, han llevado a que en la actualidad se hayan retirado algunos de los fungicidas más importantes. Estos problemas han llevado a que en la actualidad se considere un tema prioritario el desarrollo de sistemas alternativos al uso de fungicidas en la lucha contra las enfermedades de los cultivos.

El objetivo principal de la presente tesis es el desarrollo de nuevas estrategias para el control de *Botrytis cinerea* basadas en la inducción de la resistencia natural de la planta. Este objetivo ha sido abordado a través de dos aproximaciones experimentales cuyo desarrollo se describe en dos capítulos:

1. El trabajo que se describe en el primer capítulo de la presente tesis se centra en el estudio del papel de las β -1,4-endoglucanasas Cel1 y Cel2 en la interacción tomate-*Botrytis*.
2. El trabajo que se describe en el segundo capítulo apuesta por el uso de compuestos antifúngicos de baja toxicidad y el uso de inductores de las defensas naturales de las plantas en el sistema tomate-*Botrytis*, como una posible alternativa al uso de los fungicidas actuales para el control pre- y postcosecha de la podredumbre gris.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Genotipos

En el capítulo I se han utilizado varios genotipos de tomate que se recogen en la siguiente tabla:

| | | Cultivares | | |
|--|---|--|-----------------|-----------|
| | | T5 | Ailsa Craig | Pearson |
| Tipo de variación genética respecto del cultivar silvestre | Plantas transgénicas antisentido | Anti-Cel1 Anti-Cel2 Anti-Cel1-Cel2 | | |
| | Mutantes | | <i>rin</i> | <i>Nr</i> |
| | Mutantes modificados genéticamente | | <i>rin-Cel2</i> | |

La herramienta principal de la que disponemos para llevar a cabo el estudio de las β -1,4-endoglucanasas (EGasas) consiste en plantas modificadas genéticamente, que se han transformado con los genes de las EGasas en orientación antisentido. Las plantas transgénicas antisentido fueron obtenidas por transformación del cultivar T5 con el gen *Cel1* (Anti-Cel1) o *Cel2* (Anti-Cel2) en orientación antisentido (Lashbrook y col., 1998; Brummell y col., 1999). La línea anti-Cel1-Cel2 fue generada por cruzamiento de las líneas Anti-Cel1 y Anti-Cel2. Se trata, por tanto, de plantas antisentido en las que, de forma constitutiva, no se expresa *Cel1* (plantas anti-Cel 1), *Cel2* (plantas anti-Cel2) o ninguna de las 2 (plantas anti-Cel1-Cel2) (Brummell y col., 1999; Brummell & Harpster, 2001; Lashbrook y col., 1998). Estas plantas no muestran un fenotipo diferente al del cultivar silvestre, salvo que las Anti-Cel1-Cel2 muestran un ligero retraso en la tasa de desarrollo.

Por otra parte, se disponía de plantas mutantes de maduración. En concreto, se disponía del mutante *Never ripe* (*Nr*) en el fondo genético del cultivar Pearson y del mutante *ripening inhibitor* (*rin*) en el fondo genético de *Ailsa Craig*. Los frutos *rin* y *Nr* recolectados 36 días post-antesis (equivalente al estado de maduración verde-

maduro) son casi idénticos a los frutos de los correspondientes cultivares control en cuanto al tamaño, color y morfología y también muestran un desarrollo del lóculo similar. Sin embargo, mientras que los frutos del cultivar control continúan el proceso de maduración normal que conlleva la coloración y el ablandamiento de los tejidos, los mutantes *rin* y *Nr* muestran un retraso en la maduración; Los frutos continúan verdes y no se da el ablandamiento de los tejidos. Varias semanas después de que los frutos del cultivar control han completado la maduración, los frutos *Nr* alcanzan una coloración anaranjada y un ablandamiento marginal de los tejidos (Rick & Butler, 1956; Hobson, 1967). Se observa el mismo fenotipo de maduración en los mutantes *rin* aunque en su caso los frutos alcanzan una coloración amarilla (Herner & Sink, 1973). Las plantas *rin-Cel2* se obtuvieron transformando el mutante *rin* con el gen *Cel2* usando un promotor específico de fruto (Alan Bennett, no publicado). Los frutos *rin-Cel2* muestran el mismo fenotipo que los frutos *rin* pero alcanzan la coloración amarilla en menos tiempo que los frutos *rin* y muestran un mayor grado de ablandamiento en los frutos amarillos.

Para los estudios del capítulo II, se han usado plantas del cultivar *Ailsa Craig*, del mutante deficiente en ácido jasmónico *defenseless-1* y del mutante deficiente en ácido abscísico *flacca* en el fondo genético *Ailsa Craig*. Las semillas de los mutantes fueron proporcionadas por el "Tomato Genetics Resource Center" (Davis, USA).

También se utilizaron plantas del cultivar enano MicroTom.

Cultivo de Plantas

Para los estudios en planta las correspondientes semillas se sembraron en vermiculita. Las plantas se mantuvieron en vermiculita irrigada con solución nutritiva de Hoagland (pH=6) en condiciones de cámara de cultivo hasta alcanzar las 3 semanas de desarrollo. Después, las plantas se transfirieron a medio hidropónico, en cajas transparentes, conteniendo gradillas como soporte, y se mantuvieron en adaptación a la solución de Hoagland a 20 °C con fotoperiodo de 16h de luz/ 8h de oscuridad durante 5 días para su posterior inoculación o tratamiento. Las semillas de MicroTom se sembraron en maceta con turba y fueron mantenidas en cámara a 24°C con fotoperiodo hasta el desarrollo de los frutos.

Obtención de Frutos

Para la obtención de frutos de tomate se sembraron semillas de los distintos cultivares en maceta con turba y perlita. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero, regadas por sistema de goteo hasta el desarrollo de los frutos para

su cosechado. Las flores fueron marcadas en el momento inmediatamente posterior a la antesis, es decir, cuando el ovario fecundado medía entre 2-3 mm de diámetro, para obtener frutos del mismo tiempo de desarrollo. Los frutos se clasificaron en cuanto a su estado de maduración según el siguiente criterio:

| <u>Estado de maduración</u> | <u>Descripción</u> | <u>Días posteriores a la antesis (d.p.a.)</u> |
|-----------------------------|---|---|
| Verde maduro | Fruto verde, lóculo sólido, semillas desarrolladas. | 36 d.p.a. |
| MG4 | Fruto verde, lóculo licuado y ligeramente coloreado. | 40 d.p.a. |
| Pintón | Leve color rosado visible en la parte inferior del fruto. | 42 d.p.a. |
| Rosado | 10%-30% de la superficie del fruto rosada. | 44 d.p.a. |
| Rosa | 30%-70% de la superficie del fruto rosada. | 47 d.p.a. |
| Rojo (maduro) | 100% de la superficie del fruto roja. | 51 d.p.a. |
| Sobremaduro | Fruto rojo oscuro y blando. | >51 d.p.a. |

Patógeno

El patógeno utilizado fue el hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* CECT2100, procedente de la colección española de cultivos tipo. Se sembraron rutinariamente esporas de *B. cinerea* a partir de un glicerinado original, en placas petri sobre PDA (*Potato dextrose agar*, DIFCO, 213400), para los ensayos *in vitro* y sobre PDA suplementado con 40 mg/mL de hoja de tomate liofilizada, para los experimentos de infección en plantas y frutos de tomate. Las placas se mantuvieron en cámara incubadora a 24°C, con luz suave.

Obtención de esporas de B. cinerea

Se obtuvieron esporas a partir de placas sembradas con *B. cinerea* de 15 días de incubación mediante el rascado en esterilidad. Las esporas se resuspendieron en 10 ml de tween 20 (Sigma, 27,434-8) al 0,02%, se filtraron a través de algodón estéril

y se centrifugaron a 1700 x g durante 20 minutos. El sedimento de esporas se resuspendió en 1 ml de agua estéril y se lavó dos veces mediante centrifugación a 19000 x g durante 5 minutos. La suspensión de esporas resultante fué diluída adecuadamente para el conteo de esporas al microscopio, en un hemocitómetro (cámara de Neubauer). La concentración de esporas se ajustó en agua para los ensayos *in vitro* y para las infecciones en fruto y en planta, las esporas se resuspendieron en medio de Gambor B5 (Duchefa) suplementado con sacarosa 0,1mM y K₂PO₄ 0,1 mM.

Ensayos *in vitro*

Efecto de distintos tratamientos sobre la germinación de esporas de B. cinerea.

Diseño de los ensayos

Para testar el efecto del AAME (ACROS-ORGANICS, 15368.1000), del ácido hexanoico (SIGMA, 153745) y de otros fungicidas sobre la germinación, se dispusieron en cada caso tubos de ensayo de tapón de rosca de 16 mm x 125 mm (15 ml de capacidad) para cada condición o tratamiento, con 3 ml de PDB (*potato dextrose broth*, DIFCO, 254920) 2x (48 g/L) . Se obtuvo PDB 1x (24 g/L) mediante la adición de 3ml de agua destilada estéril, con la concentración adecuada del compuesto a ensayar a partir de una solución stock. En los ensayos diseñados para testar el efecto del pH, se prepararon varias soluciones con la misma concentración de AAME o de ácido hexanoico y cada una se ajustó a a pH=3,6, 4,6 o 5,5 con HCl 1N o con NaOH 1N. Se prepararon dos tubos para cada tratamiento (concentración/pH).

Una vez que los medios de ensayo estaban preparados, se añadieron esporas a partir de la suspensión stock, hasta conseguir una concentración de 4x10⁶ esporas/ml. Se tomaron dos muestras de 1ml de cada tubo y se dispusieron en una placa estéril de 24 pocillos (SARSTEDT, 831836). Las placas y los tubos con el resto del volumen de la mezcla de ensayo (4ml), se incubaron a 20°C en oscuridad, sobre un agitador orbital con agitación suave (150 rpm).

Para comparar la eficacia del ácido hexanoico y del AAME con fungicidas comercializados se utilizaron: el fosetil aluminio (Aliette, Bayer), un fungicida sistémico del grupo de los alcoilfosfonatos; el tebuconazol (Folicur, Bayer), un fungicida de amplio espectro del grupo de los triazoles, con acción de contacto y sistémico y el benomilo (Aragro), un fungicida de contacto, del grupo de los carbamatos, cuyo poder fungicida se manifiesta a dosis muy bajas y está indicado especialmente para el control de *Botrytis cinerea*.

Determinación del porcentaje de germinación. Mínima concentración inhibitoria (MCI)

A las 24 horas de incubación se tomó una alícuota de 5 μ L de cada pocillo de la placa y se mezcló con 5 μ L de Lactofucsina al 0,1%. Se procedió a su observación microscópica para determinar la germinación de las esporas. Se consideró que las esporas estaban germinadas si el tubo germinativo se había desarrollado hasta alcanzar una longitud igual o superior al propio tamaño de la espora. Se examinaron 100 esporas en cada una de las cuatro réplicas técnicas de cada ensayo. Se estableció como MCI aquella concentración del compuesto (AAME o ácido hexanoico) capaz de inhibir completamente la germinación de las esporas de *B. cinerea* a cualquiera de los pHs testados.

Determinación de la eficacia del tratamiento a los 7 días. Determinación del peso seco del micelio

Para determinar el efecto de los distintos tratamientos a más largo plazo, los tubos que albergaban 4mL de la mezcla de ensayo fueron incubados durante 7 días, en agitación suave y en oscuridad. Tras el periodo de incubación, 3 ml de su contenido se filtraron a vacío a través de filtros de nitrocelulosa (previamente secados hasta peso constante en estufa a 80°C) de 24 mm de diámetro y 0,45 μ m de luz de poro (Millipore, HAWP02500) y una vez secos hasta peso constante, se estimó la masa del micelio formado.

Determinación de la reversibilidad del efecto del tratamiento sobre la germinación. Mínima concentración fungicida (MCF)

Para determinar la reversibilidad de los tratamientos ensayados se incubó 1ml de las mezclas de ensayo descritas previamente en tubos eppendorf (2 por tratamiento) durante 24 horas, en oscuridad y con agitación suave. Pasado dicho periodo de incubación, se determinó el porcentaje de germinación y se eliminó el tratamiento con tres lavados sucesivos de las esporas centrifugando a 17000 x g durante 5 minutos y resuspendiendo con agua destilada estéril. Tras los lavados las esporas se resuspendieron en 1 ml de PDB fresco y se incubaron 24 horas en oscuridad y con agitación suave. Se determinó de nuevo el porcentaje de germinación. Se estableció que la MCF era aquella concentración de AAME o de ácido hexanoico, que inhibiera completamente la germinación de las esporas de *B. cinerea* de forma irreversible a cualquiera de los pHs testados.

Efecto de los distintos tratamientos sobre el crecimiento del micelio

Para determinar el efecto sobre el crecimiento del micelio se añadieron 9×10^6 esporas de *B. cinerea* a 150 ml de PDB en matraces de 0,5 L y se incubaron durante 24 horas en oscuridad, con agitación suave. Se confirmó la germinación de las esporas mediante observación microscópica y se añadieron los diferentes tratamientos a partir de una concentración stock del compuesto antifúngico, ajustando el pH a 5,5 mediante la adición de NaOH 1N. Los matraces se incubaron durante 4 días en las mismas condiciones. El micelio se filtró a través de una muselina, se lavó y se colocó sobre discos de papel de filtro previamente secos hasta peso constante. Después los discos con el micelio se incubaron a 80°C, hasta lograr peso constante, para determinar el peso seco de micelio crecido en las diferentes condiciones testadas.

Determinación de la actividad lítica del AAME y del ácido hexanoico

Para determinar la posible actividad lítica del AAME y del ácido hexanoico se incubaron 30 mL de una suspensión de $1,5 \times 10^6$ esporas/ml a 20°C, en oscuridad y con agitación suave, durante 20-24 horas. Se confirmó la germinación de las esporas mediante observación microscópica y se recogieron mediante centrifugación a 1700 x g, durante 20 minutos. Se lavaron dos veces en tampón salino de gelatina bovina (BSG) [gelatina bovina tipo B (SIGMA, G-9382) al 0,1% (p/v), NaCl al 0,85% (p/v), KH_2PO_4 al 0,03% (p/v) y Na_2HPO_4 al 0,06% (p/v)] y finalmente se resuspendieron en 8 ml de BSG. Se mezcló 1 ml de esta suspensión con una solución a la concentración adecuada de AAME, de ácido hexanoico, de BSG como control negativo o de liticasa (SIGMA, L-4025, concentración final 1mg/ml) como control positivo. La mezcla se dispuso en tubos de tapón de rosca de 16 mm x 125 mm (15 ml de capacidad). A las dos horas de incubación, con agitación suave a 30°C, las muestras se tiñeron con lactofucsina, tal y como se ha descrito anteriormente y se analizaron por visualización microscópica. Las condiciones de incubación y el tratamiento con liticasa se basaron en un protocolo descrito para la detección rápida de actividad lítica contra hongos filamentosos (Jewell y col., 2002).

Determinación del efecto del AAME y del ácido hexanoico sobre la permeabilidad de la membrana de B. cinerea

Medida del flujo de fosfato al medio extracelular

Para determinar si se alteraba la permeabilidad de las membranas de *B. cinerea* se midió la liberación al medio extracelular de iones fosfato del hongo tratado con AAME o con ácido hexanoico, tal como se había descrito previamente por otros autores (Cotoras y col., 2004), con las siguientes modificaciones. Las esporas de *B. cinerea* se sembraron en 5 ml de PDB en un tubo de tapón de rosca de 16 mm x 125 mm (15 ml de capacidad) alcanzando una concentración de 4×10^6 esporas/ml. Los tubos se incubaron durante 3 días a 20 °C, en oscuridad y con agitación suave. Tras ese tiempo los tubos se sometieron a una centrifugación suave (3645 x g durante 30 segundos) para eliminar el PDB y reemplazarlo por el mismo volumen de tampón Tris-HCl 5 mM pH=7, como control negativo, o de tampón conteniendo AAME 20 mM o ácido hexanoico 20 mM. Como control positivo se utilizó saponina (Sigma, S-4521) a una concentración de 100 mg/mL en tampón acetato sódico 10 mM pH= 4,5. Las saponinas interaccionan con los esteroides de la membrana celular generando poros en la membrana y aumentando la permeabilidad, de manera que el contenido intracelular de iones fosfato fluye hacia el medio extracelular (Mendoza y col., 1997).

Los tubos se incubaron 6 horas a temperatura de laboratorio sobre un agitador de vaivén basculante a 20 rpm. Después se centrifugaron a 3645 x g durante 15 minutos. Se midió la concentración de iones fosfato en el sobrenadante por cromatografía de intercambio iónico, mediante un cromatógrafo Dionex 120, equipado con un detector de conductividad, con una columna de autosupresión ASRS-ultra de 4 mm y una columna analítica Ionpac AS9-HC 4x250 mm, con un flujo isocrático de 1 ml/minuto, usando Na_2CO_3 como eluyente.

Test de exclusión de la eosina (EET)

Para determinar el efecto sobre la permeabilidad de la membrana mediante observación microscópica, se realizó el test de exclusión de la eosina (EET), previamente utilizado en otros sistemas (Lin y col., 1998).

Para ello, esporas de *B. cinerea*, germinadas en 4 ml de PDB durante 20-24 horas en oscuridad y sin agitación, a una concentración de 1×10^6 esporas/mL se centrifugaron a 2151 x g durante 7 minutos para eliminar el PDB y sustituirlo por el mismo volumen de tampón Tris-HCl 5 mM pH=7 como control negativo, por el mismo volumen tampón conteniendo AAME 20 mM, de ácido hexanoico 20 mM o de

saponina 100 mg/mL en tampón acetato sódico 10mM pH=4,5, como control positivo. Las esporas germinadas se incubaron en los correspondientes medios de ensayo durante seis horas, a temperatura ambiente sobre un agitador de vaivén basculante a 20 rpm. Tras 6 horas, se tomó una alícuota de 5 μ L de cada mezcla de ensayo y se mezcló con un volúmen igual de eosina B (MERCK, 1159340025) preparada al 0,2% (p/v). La eosina B es un colorante vital que penetra en la célula si la permeabilidad de la membrana está alterada (de Victoria & Galván, 2003; Ducci y col., 2002).

Infecciones con *Botrytis cinerea*

Infección en planta entera

Las esporas de *B. cinerea* se extrajeron, como se ha descrito previamente, de un cultivo del hongo en placa de PDA suplementada con hojas de tomate, de 15 días de desarrollo. Para las infecciones en planta se preparó una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 esporas/mL en medio de Gambor B5 (Duchefa) suplementado con sacarosa 0,1 mM y K_2PO_4 0,1 mM y se incubaron las esporas sin agitación durante dos horas.

La inoculación en las plantas de 4 semanas de desarrollo, mantenidas en condiciones hidropónicas, se realizó mediante aplicación de 5 μ L de la suspensión de esporas en cada uno de los 5 folíolos de la tercera y cuarta hoja de cada planta. Tras la inoculación se cerró la caja con una tapa transparente, para mantener alta la humedad relativa. Las cajas se mantuvieron a 20°C con un fotoperiodo de 16h de luz/ 8 h de oscuridad durante el periodo de infección.

Infección en hoja aislada

Se cortaron folíolos de la tercera hoja (hoja madura) de la planta y se cortó la 14ª hoja (hoja joven, con sus 5 folíolos juntos) de plantas del cultivar *Ailsa Craig* de 3 meses de desarrollo y se dispusieron de forma independiente en placas petri de 20 cm de diámetro (Sarstedt, 831802003) con el peciolo dentro de otra placa Petri de 5 cm de diámetro (Sarstedt, 831801003), conteniendo agua destilada. En la placa Petri grande se dispuso una base de papel de filtro empapado en agua destilada estéril para mantener una humedad relativa alta. Las hojas se inocularon mediante la aplicación de 5 μ L de una suspensión de esporas 1×10^6 esporas/ml (preincubadas en medio de Gambor suplementado con sacarosa 0,1 mM y K_2PO_4 0,1 mM) por folíolo y seguidamente se cerró la placa petri grande con su tapa transparente para

mantener la humedad. Las cajas se mantuvieron a 20°C con un fotoperiodo de 16h de luz/ 8 h de oscuridad durante el periodo de infección.

Infección de plantas de tomate cv. MicroTom

Para las infecciones en MicroTom, se utilizaron plantas desarrolladas hasta la aparición de los primeros frutos maduros. Las plantas fueron cultivadas y mantenidas en turba a 20°C, con fotoperiodo de 16h de luz/ 8 h de oscuridad. Se dispusieron las plantas en cajas transparentes para la infección. Para mantener la humedad relativa alta, se colocó una base de papel de filtro empapado en agua destilada estéril. Las inoculaciones se realizaron aplicando 5 µL de una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 esporas/mL preincubadas en medio de Gambor B5 (Duchefa) suplementado, sobre quince folíolos de varias hojas escogidas al azar. Tras la inoculación se cerró cada caja con una tapa transparente para mantener la humedad. Las cajas se mantuvieron en las mismas condiciones previas durante todo el periodo de infección. Tras la realización de algunos ensayos de puesta a punto de la infección, se estableció un tiempo de infección de 7 días postinoculación (d.p.i.) para las plantas MicroTom.

Infección en frutos de tomate

Se utilizaron dos sistemas de inoculación: por herida y por spray.

Infección por herida

Las infecciones se realizaron sobre frutos recién cosechados que, una vez clasificados según su estado de maduración, se esterilizaron en su superficie bañándolos en lejía comercial diluida al 10%, durante 10 minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua y se secaron.

Se realizaron cuatro incisiones de 3 mm de diámetro y 3 mm de profundidad equidistantes en la zona ecuatorial del pericarpio de cada fruto y se inocularon en cada una de ellas 5µL de una suspensión de esporas de 4×10^6 esporas/mL en agua destilada estéril. Los frutos se colocaron sobre placas petri en cajas opacas con base de papel de filtro húmedo. Las cajas se mantuvieron cerradas a 20° C, para mantener un alto nivel de humedad relativa durante todo el periodo de infección, que se estableció en 96 horas como máximo en el caso de los frutos.

Infección por spray

Los frutos recolectados, clasificados y esterilizados en su superficie, fueron colocados sobre placas Petri en cajas con base de papel de filtro húmedo. Los frutos se inocularon pulverizando tres veces cada fruto con una suspensión de esporas de 5×10^5 esporas/mL en agua destilada estéril. Las cajas se mantuvieron cerradas a 20°C para mantener un alto nivel de humedad relativa durante todo el periodo de infección, que se estableció entre 1 y 3 semanas, dependiendo del cultivar.

Ensayos sobre soporte biológico

Para ensayar la eficacia del efecto fungicida del ácido hexanoico y del AAME sobre un huésped, se llevó a cabo un bioensayo sobre dos soportes biológicos: hoja y fruto de tomate.

Ensayo sobre fruto de tomate

Las esporas de *B. cinerea*, a una concentración de 4×10^6 esporas/ml, se trataron con ácido hexanoico 16 mM, con AAME 16 mM o con agua destilada estéril como control, en tubos eppendorf. Los tubos se mantuvieron en agitación orbital suave durante 2 horas, a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación, la mitad de la suspensión de esporas de cada muestra fue sometida a tres lavados sucesivos por centrifugación a $17949 \times g$, durante 5 minutos y resuspensión con agua destilada estéril, para eliminar el tratamiento aplicado (AAME o ácido hexanoico). Esta suspensión de esporas se utilizó para comprobar si los tratamientos inhibían irreversiblemente la capacidad de *B. cinerea* para crecer sobre un soporte biológico.

Todas las suspensiones de esporas (tratadas, no tratadas y lavadas después del tratamiento) fueron utilizadas para inocular frutos maduros de tomate (cv. *Ailsa Craig*) cosechados el mismo día del ensayo. La inoculación se llevó a cabo tal y como se ha descrito en el apartado anterior, inoculando 5 μ L de la suspensión de esporas en cada herida. A las 96 horas se evaluaron los síntomas de infección y se tomaron fotografías de los frutos. Se utilizaron 8 frutos para cada tratamiento de las esporas y el experimento fue repetido tres veces.

Ensayo sobre hoja aislada

El efecto fungicida del ácido hexanoico sobre soporte biológico se ensayó, adicionalmente, sobre hojas cortadas de planta de tomate (cv. *Ailsa Craig*) de 1

mes de desarrollo. Las esporas de *B. cinerea* recién recogidas fueron incubadas a una concentración de 1×10^6 esporas/mL en medio de Gambor B5 suplementado con ácido hexanoico a una concentración no fungicida (3 mM) o a una concentración fungicida (16 mM) durante 2 horas. Tras la incubación previa con los diferentes tratamientos, se separó la mitad de cada suspensión de esporas y se sometió a sucesivos lavados, como se ha descrito anteriormente, para la eliminación del tratamiento. Todas las suspensiones de esporas (tratadas, no tratadas y lavadas después del tratamiento) fueron utilizadas para inocular la tercera y cuarta hoja aisladas de las plantas de tomate. La inoculación se llevó a cabo aplicando 5 μ L de la suspensión de esporas sobre cada uno de los 5 folíolos de cada hoja. Se utilizaron 10 plantas para cada tratamiento. Se evaluaron los síntomas de infección a las 24, 48 y 72 horas post-inoculación (h.p.i.).

Tratamientos con inductores

Para los tratamientos con inductores se utilizaron plantas de tomate cv. Ailsa Craig de 1 mes de desarrollo adaptadas a las condiciones hidropónicas durante 5 días en cajas transparentes, conteniendo gradillas como soporte. Tras la adaptación, se aplicaron los tratamientos con ácido hexanoico, ácido salicílico (Sigma, 247588) y BABA (Sigma, 162663) en solución hidropónica ajustada a pH=6. Las plantas se mantuvieron en estos medios hidropónicos con los diferentes tratamientos inductores durante 48 horas en condiciones de cámara de cultivo (20°C con fotoperiodo de 16h de luz/8 h de oscuridad) antes de la inoculación con *B. cinerea*.

Tratamientos preventivos y curativos

Se diseñaron experimentos para probar la eficacia del ácido hexanoico a una concentración fungicida aplicado por spray antes o después de la inoculación de esporas de *B. cinerea* en plantas y frutos del cultivar Ailsa Craig y en plantas con fruto del cultivar MicroTom.

Tratamientos preventivos

Tratamiento preventivo de plantas de tomate Ailsa Craig

Se aplicó mediante spray ácido hexanoico, a una concentración de 3, 16 y 20 mM en agua destilada, en plantas de tomate (cv. Ailsa Craig) de 4 semanas de

desarrollo. Las plantas no tratadas se rociaron por spray con agua destilada estéril. Treinta minutos después del tratamiento, las plantas fueron inoculadas con esporas de *B. cinerea* y mantenidas en condiciones de cámara de cultivo en cajas transparentes cerradas. Se utilizaron 10 plantas por tratamiento. A las 72 h.p.i. se determinó el avance del patógeno en cada caso, midiendo el diámetro del área de necrosis. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Tratamiento preventivo de plantas de tomate cv. MicroTom

Se aplicó mediante spray ácido hexanoico a la MCF (20 mM) en plantas del cultivar MicroTom que ya habían desarrollado frutos maduros. Las plantas no tratadas se rociaron por spray con agua destilada estéril. Treinta minutos después del tratamiento se inocularon las esporas de *B. cinerea* y las plantas se mantuvieron en condiciones de elevada humedad relativa, para favorecer la infección. Se utilizaron 6 plantas por tratamiento. A los 7 d.p.i. se midió el diámetro de la necrosis producida en las hojas de la planta. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Tratamiento preventivo de frutos de tomate

El tratamiento preventivo de frutos de tomate (cv. *Ailsa Craig*) consistió en la aplicación de ácido hexanoico 20mM por spray a frutos cosechados, clasificados según su estado de maduración, esterilizados y heridos por 4 punciones sobre el pericarpio en la zona ecuatorial. Los frutos no tratados se rociaron por spray con agua destilada estéril. Se utilizaron una media de 6 frutos de cada estado de maduración, para cada condición (tratado y no tratado con ácido hexanoico). Una vez rociados todos los frutos con ácido hexanoico 20 mM o con agua destilada estéril, se procedió a su inoculación con esporas de *B. cinerea*. Se evaluaron los síntomas de infección 96 h.p.i. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Tratamientos curativos

Tratamiento curativo de plantas de tomate Ailsa Craig

Plantas de tomate (cv. *Ailsa Craig*) de 4 semanas de desarrollo, tras 48 h después de la inoculación con *B. cinerea*, se trataron mediante spray con concentraciones fungicidas de ácido hexanoico (16 mM y 20 mM). Las plantas no tratadas se rociaron por spray con agua destilada estéril. Se utilizaron 10 plantas por

tratamiento. A las 72 h.p.i. se determinó el avance del patógeno en cada caso, midiendo el diámetro del área de necrosis. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Tratamiento curativo de plantas de tomate cv. MicroTom

Seis plantas del cultivar MicroTom, que ya habían desarrollado frutos maduros, se inocularon con esporas de *B. cinerea*. Las plantas se mantuvieron en condiciones de elevada humedad relativa, para favorecer la infección. A las 48 h.p.i. se confirmó que se había establecido la infección visualizando los puntos necróticos y las plantas fueron tratadas mediante spray con ácido hexanoico 20 mM. Se utilizaron 6 plantas por tratamiento. Las plantas no tratadas se rociaron por spray con agua destilada estéril. A los 7 d.p.i. se midió el diámetro de la necrosis producida en las hojas de la planta. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Tratamiento curativo de frutos de tomate

El tratamiento curativo de frutos de tomate (cv. Ailsa Craig) consistió en la aplicación por spray de ácido hexanoico 20 mM a frutos inoculados con esporas de *B. cinerea* mediante herida 24 horas antes del tratamiento. Los frutos no tratados se rociaron por spray con agua destilada estéril. Se utilizaron una media de 6 frutos de cada estado de maduración para cada condición (tratado y no tratado con ácido hexanoico). Después de 96 h.p.i. se evaluaron los síntomas de infección. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Evaluación de los síntomas de la infección

En todos los experimentos de infección en planta, hoja aislada y fruto inoculado mediante herida, se evaluaron los síntomas de infección midiendo el diámetro del área de necrosis generada en cada punto de inoculación, con un pie de Rey. Las infecciones realizadas en fruto por spray se evaluaron determinando el número de frutos infectados, respecto del número total de frutos inoculados, representado en unidades de porcentaje.

Inmunodetección de la EGasa Cel1

Extracción de proteínas

Las proteínas solubles de los diferentes tejidos de la planta y del fruto de tomate se extrajeron mediante un protocolo previamente descrito (González-Bosch y col., 1997) con algunas modificaciones. Los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de la extracción.

Los tejidos fueron triturados en nitrógeno líquido, usando un mortero hasta la textura de polvo fino. El polvo se recogió en un tampón compuesto por Tris-HCl 20 mM (pH=8), EDTA 3 mM y NaCl 0,5 M. La mezcla fue homogenizada en tampón frío durante 1 minuto a alta velocidad con un politrón y después se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se pasó por filtros de nitrocelulosa (Millipore, SLHV025LS) y las proteínas del filtrado se precipitaron mediante la adición de acetona fría al 80% (v/v), durante 16h a -20°C . El precipitado se recogió por centrifugación a 15000 x g durante 15 minutos y se resuspendió en un tampón compuesto por Tris-HCl 20 mM (pH=8), EDTA 3 mM, sacarosa 250 mM y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 2 mM.

Las proteínas obtenidas en cada extracto se cuantificaron mediante el método de Bradford (1976) por interpolación en curvas patrón de seroalbúmina bovina (BSA).

Western blot

Las proteínas de los extractos fueron separadas mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970) en un gel de empaquetamiento de acrilamida (BioRad, 161-0122) al 5% (p/v) y un gel de resolución de acrilamida al 10% (p/v) en un tampón compuesto por Tris 0,12 M, glicina 1 M y SDS 17 mM. Las proteínas ya separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, RPN303D) a 250 mA durante 1 hora, en un tampón de transferencia compuesto por Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS al 0,03% y metanol al 20%. De cada extracto de proteínas se cargaron 60 μg en el gel, en el caso de las proteínas de fruto y 30 μg en el caso de las proteínas de planta. Después de la transferencia se comprobó la igualdad de carga de proteína mediante tinción con Ponceau-S (Sigma P7767). El bloqueo de la membrana donde no había proteína se realizó incubando la membrana con BSA (Sigma, A9647) al 3% durante 1h a temperatura ambiente.

Para la detección, la membrana se incubó 16 h con el anticuerpo policlonal específico contra Cel1, diluido en un tampón compuesto por NaCl 150 mM, Tris-HCl

10 mM (pH=8) (tampón de ensayo). Los complejos antígeno-anticuerpo fueron detectados usando un anticuerpo IgG de cabra anti-conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma, A-8025) diluido en el mismo tampón que el anticuerpo primario. Tras cada incubación con los anticuerpos la membrana se sometió a tres lavados de 5 minutos con un tampón compuesto por NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM (pH=8) y Tween 20 al 0,1% (tampón de lavado). El color sobre las bandas de Cel1 se reveló usando la sal *p*-toluidina 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato y cloruro de tetrazolio *p*-nitroblue (Sigma,72091) en un tampón compuesto por Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM (pH= 9,5).

Cuantificación de la deposición de calosa

El análisis de la deposición de calosa se llevó a cabo en hojas recogidas 72 horas después de la inoculación con *B. cinerea*. Se recogieron los folíolos de la tercera y cuarta hoja de las plantas y se incubaron en etanol cosmético al 95% (v/v), hasta que quedaron decolorados. Los folíolos fueron lavados durante 30 minutos en tampón fosfato 0,07 M (pH=7) e incubados durante 15 minutos en el mismo tampón conteniendo calcofluor al 0,025% (Sigma, F3543) y 0,05% de azul de anilina (M6900). Después los folíolos fueron lavados en el mismo tampón conteniendo 0,05% de azul de anilina, para eliminar el exceso de calcofluor. Se sustituyó el azul de anilina de lavado por azul de anilina al 0,5% y se incubó toda la noche. Cada folíolo fue lavado brevemente en azul de anilina al 0,05% y montado sobre portas de vidrio, para la observación microscópica.

Para visualizar la calosa se utilizó un microscopio de fluorescencia con filtro UV (BP,340-380nm; LP 425 nm) equipado con una cámara digital acoplada. Las deposiciones de calosa alrededor de la zona de infección se cuantificaron por análisis de imagen de las fotografías digitales, con ayuda del software Adobe photoshop 9.0. La intensidad de calosa se expresó como la media del número de píxeles amarillos correspondientes a la calosa, presentes en 10 fotografías de la misma área de infección.

Tratamiento con 2-Deoxi-D-glucosa (DDG)

Para determinar el efecto de la inhibición de la síntesis de calosa en la resistencia del tomate frente a *B. cinerea*, los folíolos de la 3^a y 4^a hoja de plantas de 4 semanas de desarrollo fueron infiltrados con 2-DDG 1,2 mM (Sigma, D-6134) utilizando una jeringa sin aguja. La infiltración se realizó 24 horas antes de la inoculación de los folíolos con esporas de *B. cinerea*.

Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR en tiempo real (RT-Q-PCR)

El análisis de la expresión de los genes se llevó a cabo en muestras de las hojas recogidas a las 72 horas de la inoculación con *B. cinerea*. Para ello se recogieron los folíolos de la tercera y cuarta hoja de 10 plantas por tratamiento o genotipo e inmediatamente, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta el momento de la extracción de RNA.

Para extraer el RNA las muestras fueron pulverizadas en un mortero, usando nitrógeno líquido. El RNA se extrajo del tejido usando un Kit ("Total Quick RNA cells and tissues Kit", TALENT, TA200TQRC1, Italia). El RNA extraído se almacenó a -80°C.

Para la RT-PCR, se digirieron 1,5 µg de RNA total con una unidad de DNasa (Promega, M6101) en 1µL de tampón 10x para la DNasa y la mezcla de reacción se llevó hasta 10µL en agua bidestilada libre de RNasas (Promega). La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. Después de la digestión, se añadió 1µL de "RQ1 DNase stop buffer" y la mezcla se incubó a 65°C durante 10 minutos para parar la reacción. El RNA purificado de posible DNA contaminante, fue utilizado para la reacción de retrotranscripción (RT).

La RT se llevó a cabo mezclando 2µL de tampón de reacción 10x (Quiagen, 509205113), 2µL de dNTPs 5mM (Promega, V1330), 2µL de oligo(dT) 10 µM (Promega, oligo(dT)15 Primer), 1µL de inhibidor de RNasa 10u/µL (Promega, N2111) y 1µL de transcriptasa (Quiagen, 509205113). La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 60 minutos. El cDNA resultante se almacenó a -20°C.

Para la reacción de PCR en tiempo real el cDNA se diluyó adecuadamente. Para obtener una curva patrón de expresión, se realizaron diluciones seriadas de un pool de todas las muestras de cDNA de un mismo experimento. La mezcla de reacción para la PCR se realizó en tubos especiales para el termociclador " Smart cycler II " (Cepheid, <http://www.cepheid.com>, USA), con 2µL de cDNA y el cocktail de PCR con la sonda Syvergreen (Quiagen, 509204143), conteniendo cebadores directo y reverso a una concentración de 0,3 µM, en un volumen total de 25µL.

Los cebadores utilizados se diseñaron con ayuda del software "Oligos" utilizando la base de datos de secuencias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La actina de tomate (Act) se utilizó como gen constitutivo para normalizar los datos. La secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados se muestra en la tabla siguiente:

| Gen | Cebador directo | Cebador reverso |
|------|-------------------------|---------------------------|
| PR1 | CCCGTGTTAGGATTGGGTATTTT | CCGTGCAATGTGGGTGTC |
| LoxD | GACTGGTCCAAGTTCACGATCC | ATGTGCTGCCAATATAAATGGTTCC |
| Act | AACTGGGATGATATGGAGAAGA | TCTCAAACATAATCTGGGTCAT |

La reacción de PCR se llevó a cabo y se monitorizó en tiempo real, en un termociclador "Smart cycler II" (Cepheid, <http://www.cepheid.com>, USA) equipado con un software para su manejo y programación de las condiciones de PCR. La secuencia de los ciclos de PCR se programó para su comienzo en la etapa de activación de la polimerasa a 95°C durante 15 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 59°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. Al final de cada PCR se realizó una curva de desnaturalización del producto de PCR, como control de la pureza del mismo.

La Ct es el ciclo al cual se cruza la zona exponencial de la curva de fluorescencia de cada muestra con la línea base de fluorescencia fijada por el usuario. Las Cts de las diluciones de las curvas patrón y de las muestras se analizaron con ayuda del software "Excell 5.0", para calcular el valor de la concentración de transcrito interpolando en la curva patrón de cada gen y este valor se normalizó con el valor interpolado a partir de la Ct obtenida para el gen de la actina de la misma muestra.

Se analizó la expresión en tres experimentos independientes y a su vez, se realizaron dos RTs independientes a partir del RNA extraído de cada muestra.

Tratamiento estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los datos se realizó con la ayuda del software "STATGRAPHICS Plus 5.1". Las medias de los datos de las distintas condiciones se compararon aplicando el test ANOVA. Las medias entre los grupos se consideraron diferentes entre sí cuando el intervalo de confianza era igual o mayor al 95% (probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta, igual o menor de 0,5).

CAPITULO I

Implicación de las β -1,4-endoglucanasas Cel1 y Cel2 en la interacción de *Solanum lycopersicum* con *Botrytis cinerea*

INTRODUCCIÓN

Papel de la pared celular en la defensa frente a patógenos

Cuando un patógeno intenta invadir los tejidos de una planta, la primera barrera que se encuentra es la pared celular. Si su penetración se frena en esta fase, se reduce considerablemente el daño celular y la planta puede desarrollar otras acciones defensivas. El componente principal de la pared celular es la celulosa. Las células vegetales están rodeadas por capas de fibrillas de celulosa de cadena larga, compuestas por 30-36 cadenas de polímeros de β -1,4-glucosa, que están unidas por enlaces de hidrógeno para formar un material cristalino e insoluble. Estas fibrillas están interconectadas por moléculas de hemicelulosa de alto peso molecular (principalmente del xiloglucano y arabinoxilano) que se unen a la celulosa por puentes de hidrógeno y están embebidas en una matriz de pectina (Vorwerk y col., 2004; Cosgrove, 2005). Estos polisacáridos de alto peso molecular, que constituyen principalmente la pared celular, están entrecruzados por enlaces iónicos y covalentes formando una red que resiste a la penetración física. Pero la pared celular no sólo constituye una barrera estructural, sino que también actúa como una defensa activa contra el avance del organismo invasor. La pared celular es un reservorio dinámico de proteínas antimicrobianas y metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de muchos patógenos (Darvill & Albersheim, 1984; Thomma y col., 2002). Se ha demostrado que las células refuerzan la pared celular en la zona adyacente al sitio de penetración del patógeno, con el objeto de frenar su avance. En esa zona se forma una papila compuesta, principalmente, por el polisacárido calosa, aunque también se acumulan intermediarios reactivos del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno, polisacáridos como la lignina y compuestos fenólicos. Este proceso va acompañado, asimismo, de un incremento en enzimas hidrolíticas y proteínas con propiedades antifúngicas (Ryals y col., 1996). Sin embargo, existe escasa información sobre si la composición química de la pared es un factor determinante en el inicio de la interacción planta-patógeno.

La deposición de polisacáridos resistentes a la acción de las enzimas hidrolíticas que producen los patógenos constituye una efectiva línea de defensa para la planta y se ha considerado la principal función biológica de la formación de la papila de calosa (Smart y col., 1986; Hippe-Sanwald y col., 1992). La calosa es un polímero de β -1,3-D-glucosa que se deposita entre la membrana plasmática y la cara interna de la pared celular primaria, como parte de la HR que se produce frente a diversos hongos y virus (Donofrio & Delaney, 2001; Ryals y col., 1996). Este polisacárido de defensa se acumula para formar una papila que impide la entrada a patógenos

principalmente biótrofos. Esta acumulación de calosa ha sido ampliamente descrita en la interacción de la cebada con el hongo biótrofo *Blumeria graminis* f. Sp. *Hordei* (Kruger y col., 2002b). El mutante de cebada *mlo* es un mutante del tipo "lesion-mimic", cuya resistencia a la infección por el hongo biótrofo obligado *Erysiphe graminis* está correlacionada con una mayor inducción de la formación de la papila. Sin embargo, esto hizo a las plantas más susceptibles a patógenos como *Magnaporthe* y *Bipolaris* (Wolter y col., 1993). Dentro de una colección de mutantes de *Arabidopsis* resistentes a la infección por *E. cichoracearum* se aisló el mutante *pmr4*, que mostraba ausencia de deposición de calosa en respuesta a la herida o al patógeno (Nishimura y col., 2003). En este caso la ausencia de calosa, debido a una mutación en la calosa sintasa, no resultó en una mayor susceptibilidad, como era lo esperado, sino en una mayor resistencia que los autores atribuyeron a la estimulación de las respuestas dependientes de SA observadas en este mutante (Nishimura y col., 2003). Recientemente se ha descrito la acumulación de calosa como un componente principal de la respuesta frente a los necrótrofos *Plectosphaerella cucumerina* y *Alternaria brassicicola* en *Arabidopsis thaliana* (Zimmerli y col., 2000; Ton & Mauch-Mani, 2004; Flors y col., 2005). En tomate se han observado deposiciones de calosa en respuesta a la infección por el virus del mosaico del pepino (Xu y col., 2003).

Señales procedentes de la pared celular

Se dispone de muchas evidencias que indican que la pared celular presenta propiedades señalizadoras implicadas tanto en la protección frente a patógenos como en la coordinación del crecimiento y desarrollo de la planta. Se ha demostrado que, en determinadas situaciones, las células de la planta perciben cambios en la composición de la pared y responden a ellos activando una red de rutas de señalización. Por lo tanto, la pared celular actuaría como un mecanismo sensor, a través del cual se podrían coordinar de manera eficaz diversas respuestas de la planta (Pilling & Hofte, 2003; Vorwerk y col., 2004).

Se han identificado diversos fragmentos derivados de polisacáridos de la pared celular, tanto fúngicos como de la planta, capaces de activar las respuestas defensivas. Estos oligosacáridos se clasifican en tres grandes grupos: quitinas y glucanos fúngicos y oligosacáridos derivados de los polisacáridos de la pared celular de la planta (Hahn y col., 1994; Ramonell y col., 2002; Bruce & West, 1982; Nothnagel y col., 1983), de los cuales los denominados oligogalacturónidos (OGAs) son los mejor caracterizados (Ridley y col., 2001). Los OGAs son fragmentos procedentes de la degradación de las pectinas debida a enzimas hidrolíticas, como

las poligalacturonasas y las pectinmetilesterasas, que son secretadas, bien por el patógeno o por la propia planta. Estos OGAs están relacionados con rutas de transducción de señales, que regulan el crecimiento y el desarrollo normal de la planta, pudiendo activar también respuestas de defensa (Pilling & Hofte, 2003; Vorwerk y col., 2004). Diversos estudios indican que la inducción de ciertos genes de defensa por parte de los OGAs está mediada por el JA (Doares y col., 1995a). Por otra parte, la aplicación de OGAs a células de tabaco cultivadas *in vitro* produjo la inducción del ácido salicílico, sugiriendo que estos oligosacáridos pueden actuar sobre las dos rutas principales de respuesta a patógenos (Klarzynski y col., 2000).

Participación de enzimas hidrolíticas de la pared celular en la interacción planta-patógeno

El estudio del papel desempeñado por enzimas hidrolíticas de pared en las defensas frente a patógenos se ha centrado, principalmente, en aquellas actividades enzimáticas dirigidas a degradar la pared celular del patógeno invasor. Estas enzimas incluyen las β -1,3-endoglucanasas y las quitinasas, que son consideradas proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), ya que son inducidas en procesos de infección (van Loon y col., 2006a). Las β -1,3-endoglucanasas constituyen la familia PR2 e hidrolizan polisacáridos específicos de la pared celular de los hongos. Su actividad incrementa la susceptibilidad del patógeno a los mecanismos de defensa de la planta y, al mismo tiempo, produce oligosacáridos que actúan como elicitores, activando las respuestas defensivas (Rose y col., 1999; Vorwerk y col., 2004). Hay quitinasas en las familias PR3, PR4, PR8 y PR11 (van Loon y col., 2006a). Las quitinasas rompen los enlaces β -1,4 del polímero β -1,4-N-acetil glucosamina (quitina). Al igual que las PR2, también actúan sobre la pared del hongo (van Loon y col., 2006a). Para contrarrestar las mencionadas actividades hidrolíticas, los patógenos han desarrollado diversos mecanismos. *Colletotrichum lagenarium*, por ejemplo, desacetila la quitina de su pared celular, con lo que el polímero resulta más resistente a la acción de las quitinasas de la planta (Punja, 2004). En el caso de *Colletotrichum lindemuthianum* la pared celular de las estructuras implicadas en la infección carecen de quitina (Blair y col., 2006). En *Cladosporium fulvum* la proteína de secreción AVR4 se une a la quitina, posiblemente para proporcionarle un escudo frente a las quitinasas (van den Burg y col. 2004). Por otra parte, los oomicetos contienen poca quitina en su pared celular y por tanto, son resistentes a las quitinasas de las plantas (Kamoun, 2003). También se ha descrito que ciertos patógenos como *Phytophthora sojae* secretan proteínas inhibitoras de las β -1,3-endoglucanasas (Rose y col., 2002).

En los últimos años se ha investigado el papel que juegan en la resistencia frente a patógenos las enzimas hidrolíticas de pared celular, implicadas en el crecimiento y desarrollo de la planta. Algunos autores han sugerido que la actividad de enzimas responsables del desensamblamiento de la pared celular constituye un factor de susceptibilidad para la planta. Es decir, que su actividad contribuye a que la interacción con el patógeno sea de tipo compatible. Así, se comprobó que mutaciones en el gen *PMR6* de *Arabidopsis*, que codifica una pectatoliasa conferían resistencia frente a *Erysiphe cichoracearum*. Estos resultados se interpretaron como una demostración de que *PMR6* constituía un factor de susceptibilidad para la planta (Vogel y col., 2002). Se comprobó, así mismo, que la resistencia mediada por *PMR6* iba acompañada de cambios en la composición de la pared celular, sin que se produjera la activación de las rutas de defensa conocidas. Por tanto, la resistencia observada en el mutante *pmr6* estaría basada en la pérdida de un gen necesario para establecer una interacción compatible.

También en *Arabidopsis* se han identificado numerosos mutantes resistentes a *Agrobacterium tumefaciens* (RAT). La mutación *rat4* se corresponde con el gen *CSLA9*, una posible glicosil-transferasa, la cual se piensa que participa en la síntesis de un polisacárido de pared desconocido (Zhu y col., 2003).

En frutos de tomate se ha estudiado el papel de la poligalacturonasa (PG) en la susceptibilidad frente a patógenos, con resultados controvertidos. Por una parte, se comprobó que frutos con actividad PG reducida eran más resistentes frente a *Geotrichum candidum* y a *Rhizopus stolonifer* (Kramer y col., 1992). Sin embargo, en trabajos posteriores en los que se usaron líneas transgénicas deficientes en PG, no se encontraron diferencias significativas en la resistencia frente a *Colletotrichum gloeosporoides* (Cooper y col., 1998).

Recientemente se ha demostrado que mutaciones en las celulosa sintasas confieren resistencia a la bacteria fitopatógena de suelo *Ralstonia solanacearum* y al hongo necrótrofo *Plectosphaerella cucumerina* en *Arabidopsis* (Hernández-Blanco y col., 2007).

Participación de enzimas de pared celular en la interacción planta-*Botrytis cinerea*

La composición de la pared celular varía significativamente de un tipo celular a otro entre especies y, a veces, dentro de la misma especie (Hazen y col., 2003; Vorwerk y col., 2004). Una cualidad que comparten todas las plantas hospedadoras de *B. cinerea* es el alto contenido en pectina de su pared celular. Esto es un reflejo de la potente maquinaria pectinolítica que posee *B. cinerea*. De hecho, posee al menos seis genes que codifican endopoligalacturonasas y su expresión es

dependiente del tipo de planta y de tejido, así como de las condiciones de incubación, lo cual sugiere cierto grado de versatilidad por parte del complejo pectinolítico (ten Have y col., 2001). Sin embargo, sólo la delección de dos de ellos supone una reducción significativa de la virulencia en muchas plantas hospedadoras (Kars y col., 2005). Las endopoligalacturonasas no son las únicas enzimas implicadas en la degradación de la pared rica en pectina y además, se asume de manera general que su eficiencia se ve reducida cuanto mayor es el grado de metilación de la pectina. Las pectin metil esterasas (PMEs), que facilitan la acción de la endopoligalacturonasas, deberían jugar un papel importante en el avance del hongo, sobre todo en tejidos vegetales ricos en pectinas con alto grado de metilación como las hojas, no ocurriendo lo mismo en el fruto, donde la pectina es de bajo grado de metilación. BCPME1 es la principal PME de *B. cinerea* (Valette-Collet, 2003). El mutante *bcpme1* resultó ser menos virulento sobre frutos de manzana, uvas y hojas de *Arabidopsis* (Valette-Collet y col., 2003). Inversamente, la expresión de inhibidores de las PME endógenas en plantas de *Arabidopsis* les confirió mayor resistencia a *B. cinerea*, sin que estos inhibidores afectasen a la PME del hongo (Lionetti y col., 2007), demostrando que el grado de esterificación de las pectinas de la pared celular de la planta o del fruto es un factor limitante para el crecimiento de *B. cinerea*.

También se ha estudiado recientemente la implicación en el proceso de infección de otras enzimas líticas de pared producidas por *B. cinerea*, como celulasas y hemicelulasas, que además son de especial interés para la presente tesis. En concreto, la delección de una β -1,4-xilanasas retrasó la formación de la necrosis y la redujo más de un 70% (Brito y col., 2006). Se ha demostrado también que en el proceso de infección se expresan otras celulasas del hongo, como Cel5A, una β -1,4-glucanasa que se expresa durante la infección de *B. cinerea* sobre hojas de tomate (Espino y col., 2005). Sin embargo, la interrupción del gen en el hongo resultó en una cepa de igual virulencia y la misma actividad β -1,4-glucanasa (Espino y col., 2005)

Las mutaciones en genes implicados en la síntesis y desarrollo de la cutina y en la estructura de la cutícula confieren resistencia a *Arabidopsis* frente a *Botrytis cinerea* (Tang y col., 2007; Bessire y col., 2007).

Por otra parte, estudios realizados por nuestro grupo con frutos de tomate infectados con hongos necrótrofos permitieron demostrar la expresión diferencial de la EGasa Cel1 tras la infección. Se comprobó que en el pericarpio de frutos infectados con *B. cinerea* se producía una reducción, tanto del transcrito, como de la proteína de Cel1 (Real y col., 2004).

Las β -1,4 endoglucanasas

Las β -1,4 endoglucanasas (EGasas) son enzimas hidrolíticas de pared celular. En tomate constituyen una familia de 8 miembros divergentes y en *Arabidopsis thaliana* se han descrito 25 (Libertini y col., 2004). Estas enzimas participan en distintos procesos fisiológicos, como la maduración del fruto, la expansión y diferenciación celular y la abscisión de órganos (Brummell y col., 1997; Catala y col., 1997; delCampillo & Bennett, 1996; Lashbrook y col., 1994; Milligan & Gasser, 1995). Aunque su sustrato fisiológico no se ha podido determinar hasta el momento, su actividad parece estar asociada con las modificaciones que tienen lugar en el xiloglucano de la pared celular durante dichos procesos (Cosgrove, 2005).

El patrón de expresión génica mostrado por las EGasas Cel1 y Cel2 de tomate las relacionó con la maduración del fruto y con la abscisión de la flor (Lashbrook y col., 1998). La obtención de anticuerpos policlonales específicos contra Cel1 permitió demostrar que existía una correlación entre la acumulación de esta proteína y los procesos de abscisión de la flor y de maduración del fruto (González-Bosch y col., 1997; Real y col., 2004). En el último caso, los resultados obtenidos indicaron que esta EGasa podía participar en el ablandamiento del pericarpio, así como en la licuefacción del lóculo. El análisis por western blot mostró un patrón de varias bandas en los tejidos analizados, que podría deberse a diversos grados de glicosilación de la proteína Cel1, en los sitios potenciales descritos tras el análisis del cDNA de *Cel1* (González-Bosch y col., 1997) o a otro tipo de modificación post-traducciona.

La expresión diferencial de Cel1 en frutos infectados con *B. cinerea* (Real y col., 2004) permitió establecer una posible relación entre las EGasas, las respuestas de defensa de las plantas y la maduración del fruto. Estas evidencias también apoyaban la idea de que la pared celular vegetal no sólo constituye una barrera física, sino que su actividad metabólica está implicada en la interacción planta-patógeno. El objetivo de este primer capítulo es profundizar en este estudio y determinar la implicación de las β -1,4-endoglucanasas Cel1 y Cel2 en la interacción de *B. cinerea* con la planta y el fruto de tomate.

RESULTADOS

Acumulación de la proteína Cel1 en *Solanum lycopersicum*

Como ya se ha descrito, al inicio del presente trabajo se disponía de datos experimentales que apoyaban la implicación de la EGasa Cel1 de tomate en varios procesos fisiológicos, como la maduración del fruto y la abscisión de la flor (Lashbrook y col., 1994; González-Bosch y col., 1997), así como su expresión diferencial durante la infección de frutos de tomate con hongos necrótrofos (Real y col., 2004).

A la vista de los resultados obtenidos en fruto, en este trabajo se procedió a caracterizar la acumulación de la proteína Cel1 en diversas partes de la planta de tomate, mediante análisis por *western blot*, haciendo uso de los anticuerpos policlonales específicos contra Cel1 (González y col., 1996). Los resultados obtenidos demostraron que la proteína Cel1 se acumulaba en el tallo y en la hoja (Figura 1a), a pesar de la baja expresión del gen *Cel1* observada previamente en dichos tejidos (Lashbrook y col., 1994).

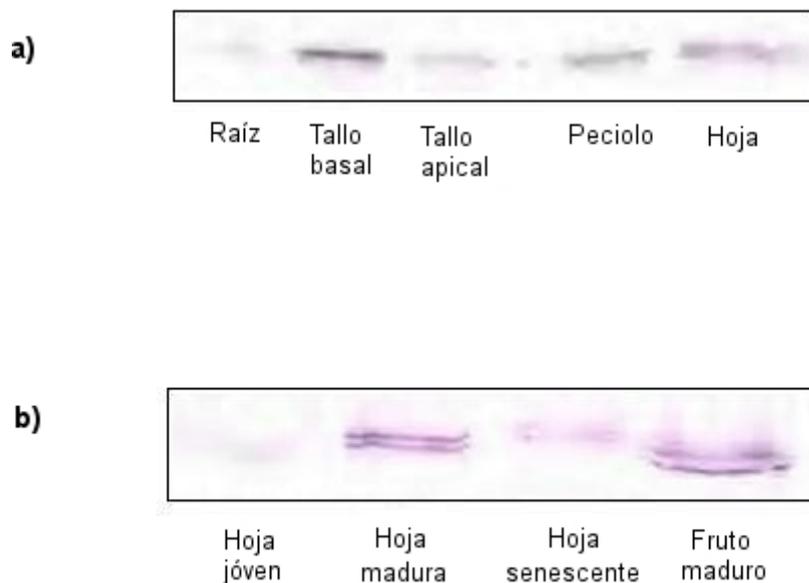


Figura 1: Análisis de la proteína Cel1 en planta de tomate. Figura 1a: Se extrajeron las proteínas del tejido de la raíz, la zona basal del tallo, la zona apical del tallo y de hojas completamente expandidas de plantas de tomate cv. Ailsa craig de 4 semanas de desarrollo. Figura 1b: Se seleccionaron hojas de la zona apical (hoja joven) de la zona intermedia (hoja madura) y de la zona basal (hoja senescente) de plantas de tomate cv. Ailsa Craig de tres meses de desarrollo. En todos los casos se separaron 30 μ g de proteínas por SD-PAGE y se analizó la acumulación de Cel1 por *western blot*. La igualdad en la carga de proteína se comprobó mediante tinción con Ponceau de la membrana previamente a la detección con anticuerpos policlonales específicos contra Cel1.

Dado que la proteína Cel1 estaba presente en hojas, se estudió su evolución durante el desarrollo de las mismas. Para ello se colectaron hojas de plantas de tomate (cv. Ailsa Craig) de 3 meses, procedentes de la zona apical (hoja joven), de la zona intermedia (hoja madura) y de la zona basal, que ya presentaban síntomas de senescencia (hoja senescente). Se comprobó mediante análisis por *western blot* que la proteína Cel1 se acumulaba preferentemente en hojas totalmente desarrolladas, disminuyendo su nivel con la senescencia (Figura 1b). Este mismo patrón de acumulación se observó en el tallo (Figura 1a). La demostración de que la proteína Cel1 está presente en hoja de tomate y el hecho de que su acumulación vaya asociada con el desarrollo de la misma, así como va asociada a la maduración del fruto de tomate, sugiere que esta EGasa puede estar también implicada en dicho proceso, así como en otros en los que participa la pared celular, como la interacción con patógenos. Este resultado permitió abordar el estudio de la participación de Cel1 en la interacción de la planta de tomate con *B. cinerea*.

Puesta a punto de la infección con *B. cinerea* en plantas de tomate

Para abordar los estudios de interacción con patógenos en hoja de tomate se puso a punto un sistema reproducible de infección con el hongo necrótrofo *B. cinerea*. Se cortaron hojas de la parte apical (hojas jóvenes) y de la parte media (hojas maduras) de plantas Ailsa Craig de 3 meses de desarrollo. Las hojas se dispusieron de forma independiente en placas petri para mantener la humedad (ver material y métodos) y se inocularon mediante la aplicación de 5 μ L de una suspensión de esporas 1x10⁶ esporas /mL por foliolo.

En estas condiciones se produjo un crecimiento radial del hongo a partir del punto de inoculación, que permitió determinar el grado de infección en cada caso midiendo el diámetro de la necrosis. Se comprobó así mismo que las hojas jóvenes eran más resistentes a *B. cinerea* que las hojas maduras (Figura 2).

Dado que el contenido en proteína Cel1 de las hojas jóvenes es inferior al de las hojas maduras (Figura 1b), el fenotipo de infección observado en ambos tipos de hojas era consistente con la participación de la EGasa Cel1 en la susceptibilidad basal de la planta frente a este necrótrofo.

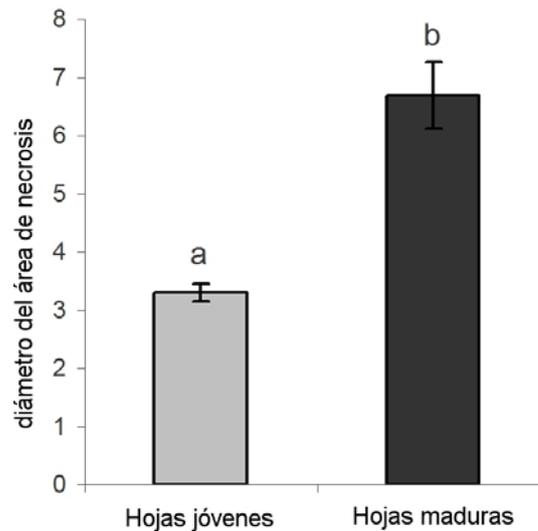


Figura 2: Infección de hojas jóvenes y maduras con *B. cinerea*. Hojas cortadas de la parte apical (hojas jóvenes) y de la parte media (hojas maduras) de plantas de tomate de 3 meses de desarrollo cv. Ailsa Craig se inocularon con 5 μ L de una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 1×10^6 esporas/mL. A las 72 horas se midió el diámetro del halo de necrosis. El gráfico muestra los datos de un experimento representativo. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$), están indicadas con letras.

Aunque habitualmente este tipo de estudios se realiza en hoja aislada, se puso a punto un sistema reproducible de infección en planta entera que permitiera una aproximación más *in vivo*. Para ello, las plantas de un mes de desarrollo, se mantuvieron en condiciones hidropónicas y se inocularon con una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 1×10^6 esporas /mL en la tercera y cuarta hoja de la planta (ver material y métodos). Los síntomas de infección se evaluaron midiendo el diámetro del área necrosada.

Estudios de infección con *B. cinerea* en plantas transgénicas antisentido

El estudio de la participación de las EGAsas en la interacción con patógenos se abordó haciendo uso de plantas modificadas genéticamente, que habían sido transformadas con los genes *Cel1* y *Cel2* en orientación antisentido en el laboratorio del Dr. Bennett y que se denominaron Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2 (Lashbrook y col., 1998; Brummell, y col. 1999; Brummell y col., 2001). Se trata, por tanto, de plantas transgénicas antisentido que de forma constitutiva no expresan *Cel1* (Anti-Cel1), *Cel2* (Anti-Cel2) o ninguna de las EGAsas (Anti-Cel1-Cel2).

Previamente a la realización de los estudios de infección, en este trabajo se analizó la acumulación de la proteína *Cel1* en hojas de plantas de 1 mes de desarrollo, tanto del cultivar silvestre (T5) como de las diferentes líneas

transgénicas, mediante análisis por *western blot*, utilizando los anticuerpos específicos para Cel1 (Figura 3).

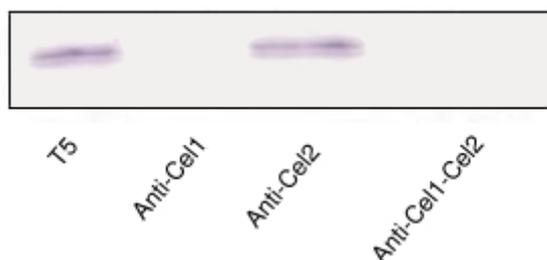


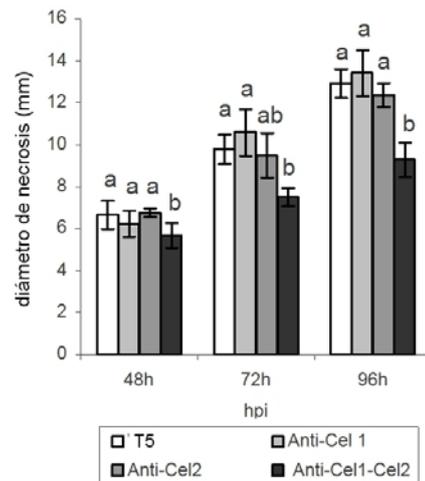
Figura 3: Análisis de la proteína Cel1 en las plantas transgénicas antisentido **Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2**. Se extrajeron las proteínas de hojas completamente expandidas de plantas de tomate cv. T5, Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2 de 1 mes de desarrollo. Se separaron 30 µg de proteínas por SDS-PAGE y se analizó la acumulación de Cel1 por *western blot*. La igualdad de la carga de proteína se comprobó mediante tinción de Ponceau de la membrana previamente a la detección con anticuerpos policlonales específicos contra Cel1.

Los resultados demostraron que la proteína Cel1 estaba ausente en las hojas de las plantas Anti-Cel1 y Anti-Cel1-Cel2. Aunque no se disponía de anticuerpos específicos frente a la EGasa Cel2, se pudo comprobar que la ausencia de expresión de *Cel2* en las plantas Anti-Cel2, no provocó un cambio en la acumulación de Cel1 en dichas plantas (Figura 3).

Para observar el fenotipo de infección de las plantas antisentido se utilizó el sistema de infección puesto a punto en planta entera.

Al infectar las plantas antisentido se comprobó que la supresión de la expresión de ambas EGAsas producía una reducción del diámetro de la necrosis de alrededor del 30 % (Figura 4 a). Era necesaria la ausencia de las dos EGAsas para observar el fenotipo de resistencia (Figura 4a), ya que las plantas Anti-Cel1 y Anti-Cel2 mostraron un fenotipo similar al de las plantas silvestres. Estos resultados confirmaban la implicación de estas EGAsas en el proceso de infección, y el hecho de que su ausencia hiciera más resistentes a las plantas señalaba a Cel1 y Cel2 como factores de susceptibilidad. No sólo se observó una reducción del área de necrosis, sino que además se observó que la zona dañada estaba más delimitada. Como se puede observar en las fotografías, en las plantas del cultivar control y en las plantas Anti-Cel1 y Anti-Cel2 el área de necrosis presenta un aspecto más tentaculado e irregular, mientras que en las plantas Anti-Cel1-Cel2 el área necrótica se observa mejor definida (Figura 4b).

a)



b)

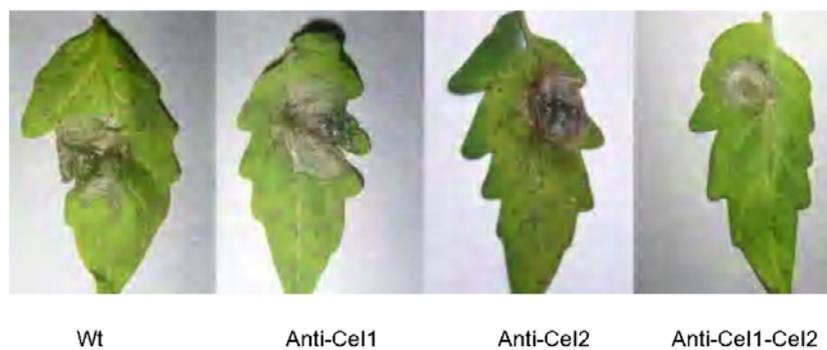


Figura 4: Infección de las plantas transgénicas antisentido Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2 con *B. cinerea*. Figura 4a: Se inocularon hojas de plantas de tomate cv. T5, Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2 de 4 semanas de desarrollo con 5 μ L de una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 1×10^6 esporas /mL en cada foliolo de la tercera y cuarta hoja. A las 48, 72 y 96 horas se midió el diámetro del halo de necrosis. Las barras muestran la media del diámetro de las necrosis en un experimento representativo ($n=10$) \pm el error estándar, para cada genotipo. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí (p -valor $< 0,05$) están indicadas con letras. Figura 4b: Fotografías de foliolos infectados de cada genotipo, a las 96 horas post-inoculación.

Estos resultados relacionan a las β -1,4-endoglucanasas de tomate con el proceso de infección, al menos como factores de susceptibilidad frente a *Botrytis cinerea*.

Estudio de la deposición de calosa

Una vez establecido que la ausencia de las EGAsas Cel1 y Cel2 en las plantas transgénicas Anti-Cel1-Cel2 reducía la susceptibilidad a *B. cinerea*, se procedió a investigar cuáles eran las bases moleculares de dicho fenómeno. Como primera aproximación se analizaron los cambios producidos en la pared celular

determinando la acumulación de calosa en el sitio de infección. La calosa es un polímero de β -1,3-D-glucosa que desempeña muchas funciones esenciales en las plantas superiores, estando implicado en el proceso de formación de papilas con el fin de contener una infección por biótrofos, aunque recientemente, se ha descrito como un componente principal en la respuesta defensiva frente a necrótrofos en *Arabidopsis* (Zimmerli y col., 2000; Ton y col., 2004, Flors y col., 2005).

En la Figura 5 se muestran los niveles de calosa acumulados en la zona de infección, en los distintos tipos de plantas inoculadas con *B. cinerea*.

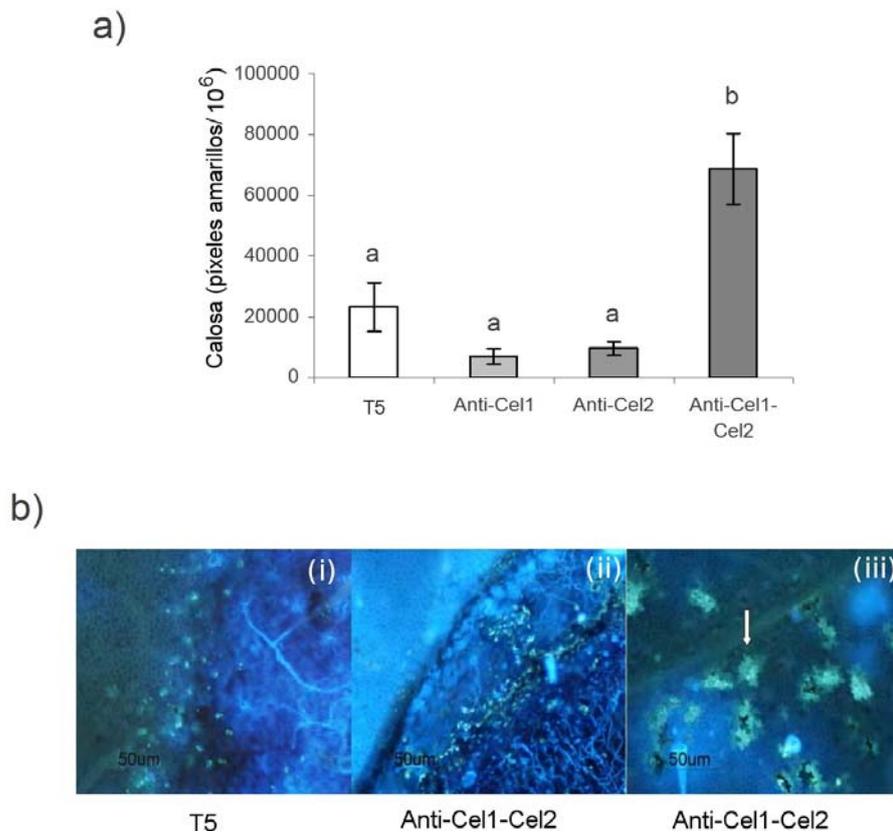


Figura 5. Acumulación de calosa en plantas transgénicas antisentido tras la infección con *B. cinerea*. Plantas de tomate cv. T5, Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2 de 4 semanas de desarrollo se inocularon con 5 μ L de una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 1×10^6 esporas/mL en cada foliolo de la tercera y cuarta hoja y 72 h.p.i. se realizó una doble tinción con calcofluor y azul de anilina y se visualizó por microscopía de fluorescencia. **Figura 5a:** La calosa depositada se cuantificó mediante análisis de imagen. Las barras muestran la media de píxeles de calosa relativos al área total de todas las imágenes microscópicas de cada foliolo analizado de un experimento representativo ($n=10$) \pm el error estándar para cada tratamiento. Los grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí (p -valor $< 0,05$) están indicados con letras. **Figura 5b:** Imágenes microscópicas del área necrótica en las plantas T5 (i) y Anti-Cel1-Cel2 (ii). La calosa se observa en color amarillo, depositada a lo largo del frente de avance de la necrosis. En la imagen de la derecha se visualizan las acumulaciones de calosa en las plantas Anti-Cel1-Cel2 con más aumento. La flecha blanca señala uno de los acúmulos de calosa (iii).

Las plantas control (cv. T5) acumulan algo de calosa, lo que demuestra por primera vez que en tomate la calosa constituye un mecanismo de defensa frente a un patógeno necrótrofo y en particular, frente a *B. cinerea* (Figura 5a).

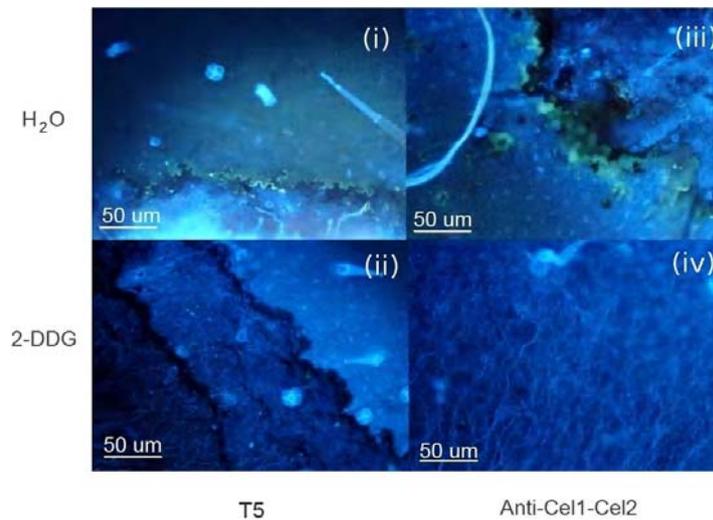
Por otra parte, la ausencia de expresión de las dos EGAsas supone un incremento en la acumulación de calosa en respuesta a la infección, lo que relaciona a las EGAsas Cel1 y Cel2 con la acumulación de este polímero de defensa (Figura 5a).

Como se observa en la Figura 5b (i-ii), en el caso de la infección por *B. cinerea*, las deposiciones de calosa se observan en el frente de avance de la necrosis, formando una barrera de contención.

Para confirmar que la sobreacumulación de calosa contribuía a que las plantas anti-Cel1-Cel2 fueran más resistentes a la infección, se diseñó un experimento de bloqueo de la producción de calosa mediante el tratamiento con el inhibidor DDG (2 desoxi-D-glucosa) (Jakab y col., 2001).

El DDG se aplicó por infiltración en los folíolos de las hojas que iban a ser inoculados con *B. cinerea*. Se confirmó que el tratamiento impedía la acumulación de calosa en respuesta a la infección, tanto en las plantas control como en las Anti-Cel1-Cel2 (Figura 6a, ii-iv) y eliminó la mayor resistencia observada en las plantas Anti-Cel1-Cel2, siendo en este caso el diámetro de necrosis equivalente al de las plantas control (cv. T5) (Figura 6b). Por tanto, estos resultados demuestran que la reducción de la necrosis observada en las plantas Anti-Cel1-Cel2 está asociada con una mayor acumulación de calosa.

a)



b)

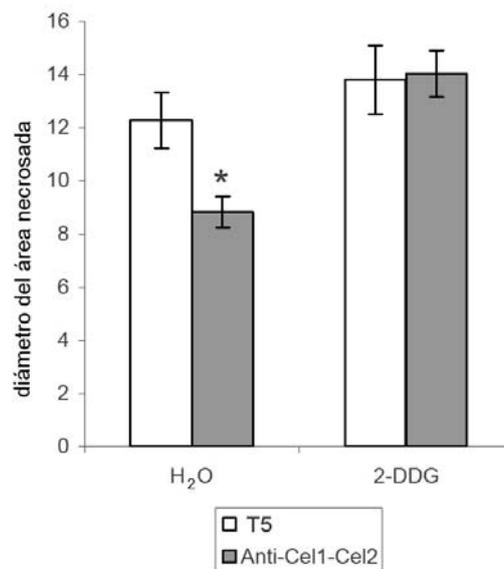


Figura 6. Efecto de la inhibición de la síntesis de calosa en la resistencia de las plantas Anti-Cel1-Cel2. Se trataron plantas de tomate cv. T5 y Anti-Cel1-Cel2 de 4 semanas de desarrollo con DDG 1,2 mM por infiltración en los foliolos de la tercera y cuarta hoja y 24 h después se inocularon 5 µL de una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 1×10^6 esporas/mL. Figura 6a: La calosa se visualizó a las 72 h.p.i. mediante tinción con azul de anilina y microscopía de epifluorescencia. Las imágenes microscópicas muestran el área necrótica a las 72 h.p.i. en las plantas T5 (i-ii) y Anti-Cel1-Cel2 (iii-iv) sin tratar (i-iii) y tratadas con DDG (ii-iv). Figura 6b: La resistencia se cuantificó a las 72 h.p.i. midiendo el área de necrosis. Las barras muestran la media del diámetro del área de necrosis \pm el error estándar para cada tratamiento. Las medias estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) se han indicado con un asterisco.

Estudio de genes marcadores de las principales rutas de respuesta a patógenos en *Solanum lycopersicum*

Para averiguar si la ausencia de las EGsas alteraba la señalización implicada en la respuesta a patógenos se midieron los niveles de expresión de genes marcadores de las principales rutas de respuesta a patógenos mediante RT-Q-PCR. PR1 es una proteína relacionada con patogénesis inducida por salicílico y la lipooxigenasa D (LoxD), está implicada en las primeras etapas de la ruta de síntesis del ácido jasmónico. Ambos genes se habían descrito previamente como genes marcadores inducibles por infección en tomate (Benito y col., 1998; Cohn & Martin, 2005).

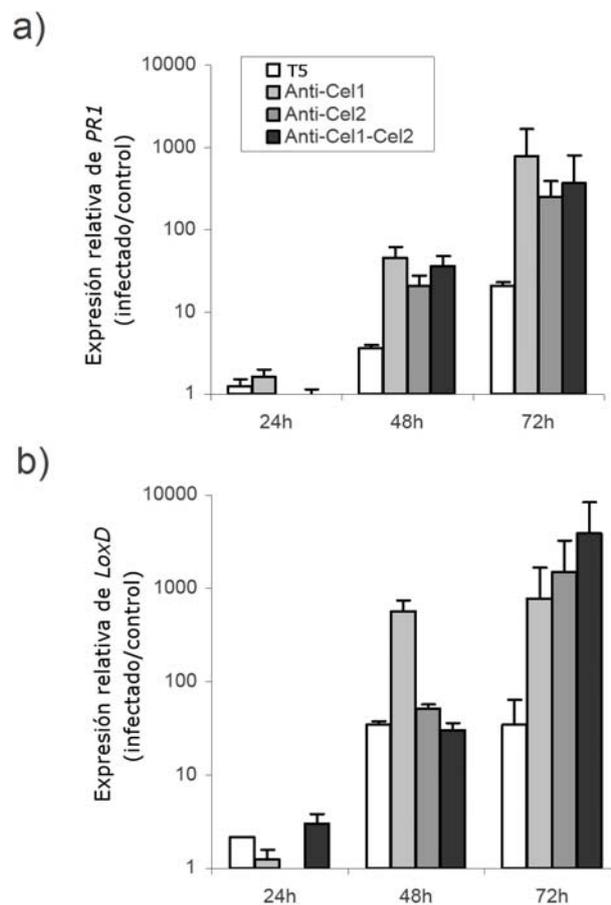


Figura 7. Niveles de expresión de PR1 y LoxD en las plantas transgénicas antisentido.

Plantas de tomate cv. T5 y Anti-Cel1-Cel2 de 4 semanas de desarrollo fueron inoculadas con 5 μ L de una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 1×10^6 esporas /mL en cada foliolo de la tercera y cuarta hoja. A las 24, 48 y 72 h.p.i. se extrajo el RNA total que se convirtió en cDNA y se analizó mediante RT-Q-PCR. Los niveles de transcrito de PR1 (Figura 7a) y de LoxD (Figura 7b) se normalizaron con relación a la expresión del gen de la actina medida en la misma muestra y a su vez se relativizó el nivel de expresión en hoja infectada con el nivel de expresión en la hoja control. Los datos están representados en escala logarítmica y son el resultado de la media de 2 réplicas técnicas de un experimento representativo. Los experimentos fueron repetidos dos veces.

Como se puede observar en la Figura 7a, la expresión de *PR1* se induce en las plantas del cultivar silvestre (cv. T5) en respuesta a la infección por *B. cinerea*, lo cual es consistente con los resultados de otros autores que afirman que la ruta de señalización dependiente de SA juega un papel en la resistencia basal de *Solanum Lycopersicum* frente a *B. cinerea* (Achuo y col., 2004). También se observó una inducción de *LoxD* en respuesta a la infección (Figura 7b), lo cual apoya la implicación de la ruta del JA en esta interacción, como se había propuesto anteriormente (Díaz y col., 2002).

Por otra parte, en las plantas Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2, *PR1* y *LoxD* sufren una inducción mayor que en las plantas control (cv. T5) en respuesta a la infección. Por lo tanto, dado que la ausencia de ambas EGAsas afecta a las principales rutas de resistencia a patógenos, cabe pensar que la actividad normal de estas enzimas esté relacionada con la susceptibilidad de las plantas frente a *B. cinerea* o, al menos, que estén implicadas en la interacción planta-patógeno.

Implicación de Cel1 y Cel2 en la interacción del fruto de tomate con *B. cinerea*

Paralelamente al estudio en planta, abordamos el estudio de las EGAsas en la interacción *B. cinerea*-fruto de tomate.

Estudios con frutos procedentes de plantas transgénicas

Dado que los resultados obtenidos con las plantas transformadas con los genes de las EGAsas en orientación antisentido evidenciaban la existencia de una relación de Cel1 y Cel2 con la resistencia frente a *B. cinerea*, se estudió el efecto producido por la ausencia de dichas EGAsas en frutos procedentes de plantas transgénicas inoculados con *B. cinerea*.

Frutos en varios estados de maduración procedentes de las plantas Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2 se infectaron con *B. cinerea* previa herida, tal y como está descrito en materiales y métodos. A las 96 horas se midió el diámetro del halo de necrosis que avanza en torno a la herida. Cuando se infectaron los frutos de las distintas plantas antisentido no se observaron diferencias significativas en el diámetro de la necrosis con respecto a las plantas silvestres, en ninguno de los estados de maduración analizados (Figura 8).

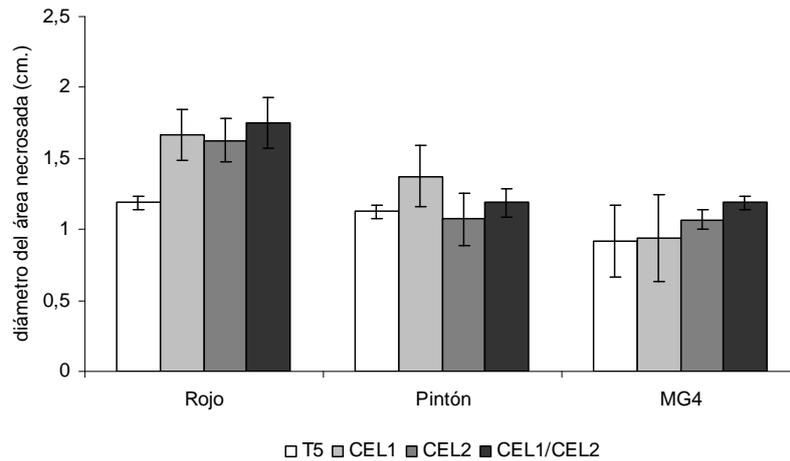


Figura 8: Infección de frutos transgénicos antisentido. Los frutos de varios estados de maduración de las plantas silvestres (cv.T5) y transgénicas Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2 se inocularon previa herida con una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 4×10^6 esporas/ml. A las 96 horas se midió el diámetro del halo de necrosis. Los datos representados son la media de las medias de las 4 áreas necróticas de cada fruto. Cada media corresponde a 6 frutos en cada estado de maduración. La figura muestra los resultados de un experimento representativo.

El hecho de no encontrar una relación entre la ausencia de las EGAsas y la respuesta a *B. cinerea* en fruto podía estar indicando que el papel de estas enzimas no es el mismo en los distintos tejidos de la planta y/o que los mecanismos de respuesta en el fruto son diferentes a los que actúan en la planta frente a este necrófito.

Al determinar la acumulación de la proteína Cel1 en los frutos antisentido por *western blot* se comprobó, sorprendentemente, que Cel1 era muy poco abundante en el pericarpio de los frutos del cultivar T5, utilizado para obtener las plantas transgénicas, por lo que era difícil determinar la ausencia de Cel1 en los frutos procedentes de las plantas Anti-Cel1 y Anti-Cel1-Cel2 (Figura 9).

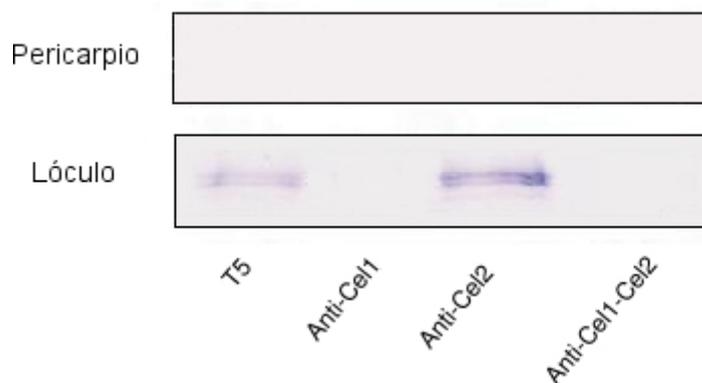


Figura 9: Determinación de la proteína Cel1 en los frutos transgénicos antisentido. Se separó el lóculo y el pericarpio de frutos maduros de las plantas T5, Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2. Se extrajeron las proteínas de ambos tejidos y se separaron 60 μ g por SDS-PAGE. Se analizó la acumulación de Cel1 por *western blot*. La igualdad de la carga de proteína se comprobó mediante tinción de Ponceau de la membrana previamente a la detección con anticuerpos policlonales específicos contra Cel1.

La proteína Cel1, sin embargo, sí se detectó en el lóculo del fruto T5, lo que permitió comprobar su ausencia en los frutos Anti-Cel1 y Anti-Cel1-Cel2. Estas observaciones pusieron de manifiesto que, dado que las inoculaciones se llevan a cabo en el pericarpio, los frutos de las plantas transgénicas antisentido no eran una buena herramienta para llevar a cabo este estudio.

Aunque no se dispone todavía de anticuerpos específicos frente a la EGasa Cel2, se pudo comprobar que la ausencia de expresión de *Cel2* en los frutos Anti-Cel2, no provocó un cambio en la acumulación de la proteína Cel1, al igual que ocurría en la hoja (Figura 9).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que *B. cinerea* es un patógeno de herida, por lo que los sistemas de infección utilizados habitualmente para inocular los frutos, requieren una incisión en el pericarpio del mismo y tal vez, las posibles diferencias de susceptibilidad en los frutos transgénicos podían haber sido enmascaradas por un sistema de infección facilitado para el patógeno.

Por ello, se diseñó un sistema de infección por spray. Este sistema se había descrito para la inoculación de frutos de tomate con otros hongos patógenos (Cooper y col., 1998). El objetivo era lograr un sistema menos agresivo de infección, ya que este sistema aprovecha los puntos de entrada naturales en frutos cosechados. La zona más vulnerable es la zona apical del fruto, por la que se ha separado de la planta. Este procedimiento nos permitiría observar la respuesta del fruto frente a una infección, más parecida a la que se puede dar en la naturaleza. Tras la inoculación de esporas de *B. cinerea* mediante spray, se produjo un crecimiento radial de la necrosis desde la cicatriz apical seguido, en ocasiones, de la extensión de micelio sobre la superficie del tejido necrosado. Para evaluar la infección en este sistema se expresaron los resultados en porcentaje de frutos infectados puesto que, a diferencia del sistema de herida, tras la inoculación por spray no todos los frutos se infectan.

En la tabla se recogen los datos de infecciones realizadas por el sistema de herida en tres cultivares de tomate diferentes (Figura 10a). En el gráfico vienen representados los datos de infecciones realizadas por spray en los mismos cultivares (Figura 10b). Utilizando la inoculación por spray se observaron diferencias de susceptibilidad entre cultivares, que mediante la infección por herida no se habían detectado. Así, se comprobó que el cultivar Pearson es más susceptible a *B. cinerea* que los cultivares T5 y Ailsa Craig. Si bien no se observaron diferencias significativas de susceptibilidad entre los cultivares T5 y Ailsa Craig a *B. cinerea* utilizando ambos sistemas de inoculación, sí se apreciaron diferencias en el modo de avance del micelio entre los frutos de ambos cultivares (Figura 10c)

debidas, probablemente, a diferencias en la estructura del pericarpio de ambos tipos de frutos.

(a)

| Estado de maduración | CULTIVAR | | | | | |
|----------------------|---------------------------|------|---------------------------|------|---------------------------|------|
| | T5 | | Pearson | | Ailsa Craig | |
| | diámetro de necrosis (cm) | SE | diámetro de necrosis (cm) | SE | diámetro de necrosis (cm) | SE |
| verde-maduro | 0,90 | 0,08 | 0,94 | 0,09 | 1,32 | 0,10 |
| pintón | 1,65 | 0,46 | 1,19 | 0,19 | 1,35 | 0,12 |
| rosado | 1,19 | 0,06 | 0,67 | 0,29 | 1,61 | 0,26 |

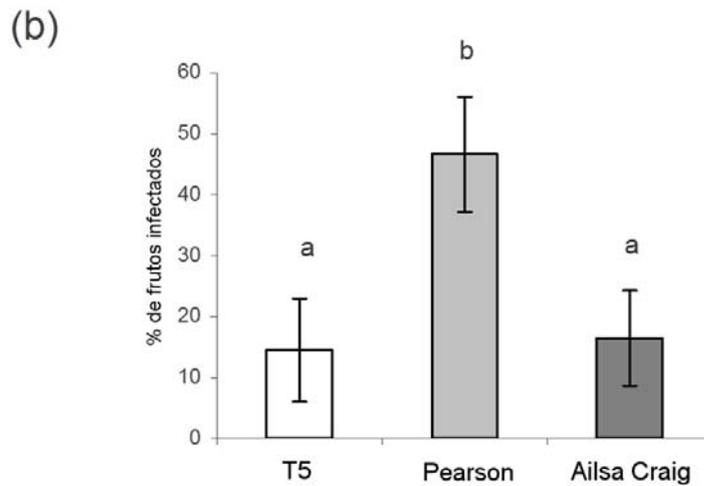


Figura 10: Susceptibilidad de los frutos de tomate de diferentes cultivares a *B. cinerea* utilizando distintos sistemas de inoculación. **Figura 10a:** Los frutos de varios estados de maduración de los cultivares T5, Ailsa Craig y Pearson se infectaron previa herida. A las 96 horas se midió el diámetro del halo de necrosis. Los datos representados son la media de los datos de tres experimentos independientes, en los cuales se usaron 4 frutos en cada estado de maduración. SE=error estándar. **Figura 10b:** 15 frutos de cada cultivar fueron inoculados pulverizando tres veces con una suspensión de esporas de *B. cinerea*. Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$), están indicadas con letras. **Figura 10c:** Fotografías de un fruto cv. Ailsa Craig y de un fruto cv. T5 tras 96h.p.i. de esporas de *B. cinerea* por el sistema de herida.

Al inocular los frutos transgénicos antisentido mediante el sistema de infección por spray no se detectaron diferencias de susceptibilidad entre ellos, ni con respecto a los frutos silvestres (Figura 11). Se pudo observar que utilizando este sistema se infectaron pocos frutos, por lo que se detectó mucha variabilidad. Por ello la infección por spray no permite obtener resultados concluyentes con los frutos transgénicos.

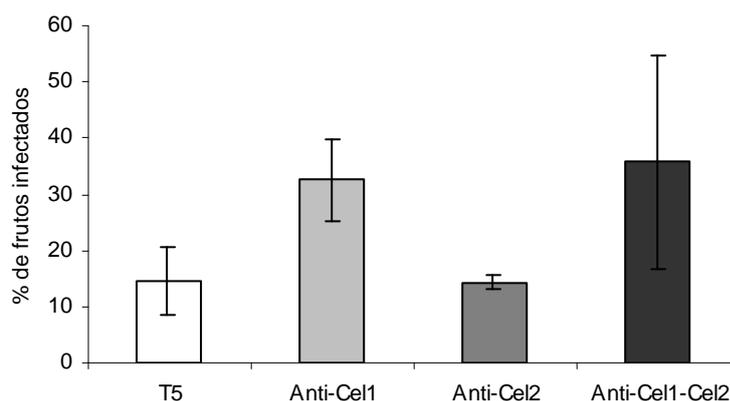


Figura 11: Infección con *B. cinerea* de los frutos transgénicos antisentido mediante el sistema de spray. 15 frutos de cada cultivar de tomate fueron inoculados pulverizando hasta cubrir la superficie del fruto con una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 5×10^5 esporas/ml. A los 20 d.p.i. se evaluaron los síntomas de la infección. Los datos mostrados son la media de dos experimentos independientes. Los datos están expresados en porcentaje de frutos infectados con respecto al total de frutos inoculados.

Estudios con mutantes de maduración

Como herramienta adicional a los frutos transgénicos antisentido disponíamos de varios mutantes de maduración para los que, en estudios previos, se había demostrado la baja expresión de estas EGasas a nivel transcripcional (González-Bosch y col., 1996). Los frutos del mutante *Never ripe (Nr)* mostraban una acumulación reducida de los transcritos de *Cel1* y *Cel2* y en el mutante *ripening inhibitor (rin)* la expresión de *Cel1* era baja y la expresión de *Cel2* virtualmente nula (González-Bosch y col., 1996). Debido a este hecho, en un intento de revertir el fenotipo de maduración de este mutante, se expresó *Cel2* usando un promotor específico de fruto (AB Bennett, datos no publicados). Los frutos mutantes con el mismo tiempo de desarrollo que los frutos del cultivar silvestre correspondiente (Ailsa Craig en el caso del mutante *rin* y Pearson en el caso de *Nr*) muestran un retraso en la maduración, que resulta incompleta (Figura 12). Los frutos *rin* muestran cierta coloración amarilla, los frutos *Nr* una coloración anaranjada y

ambos mutantes alcanzan un leve reblandecimiento mucho tiempo después de que los frutos del cultivar control hayan completado la maduración (Rick & Butler, 1956; Hobson, 1967; Herner & Sink, 1973). En el caso de los frutos *rin* la expresión de *Cel2* no revierte este fenotipo, aunque sí acelera ligeramente la maduración del fruto (Figura 12).



Ailsa Craig



rin



Pearson



Nr

Figura 12: Fenotipo de maduración en los frutos mutantes. Las fotos ilustran el fenotipo de los frutos control cv. Ailsa Craig y cv. Pearson en estado maduro (rojo) y el aspecto de sus correspondientes mutantes *rin* y *Nr* cuando alcanzan su estado de maduración máxima.

Para comprobar la ausencia de la proteína Cel1 en los distintos mutantes de maduración se llevó a cabo un análisis mediante *western blot* (Figura 13).

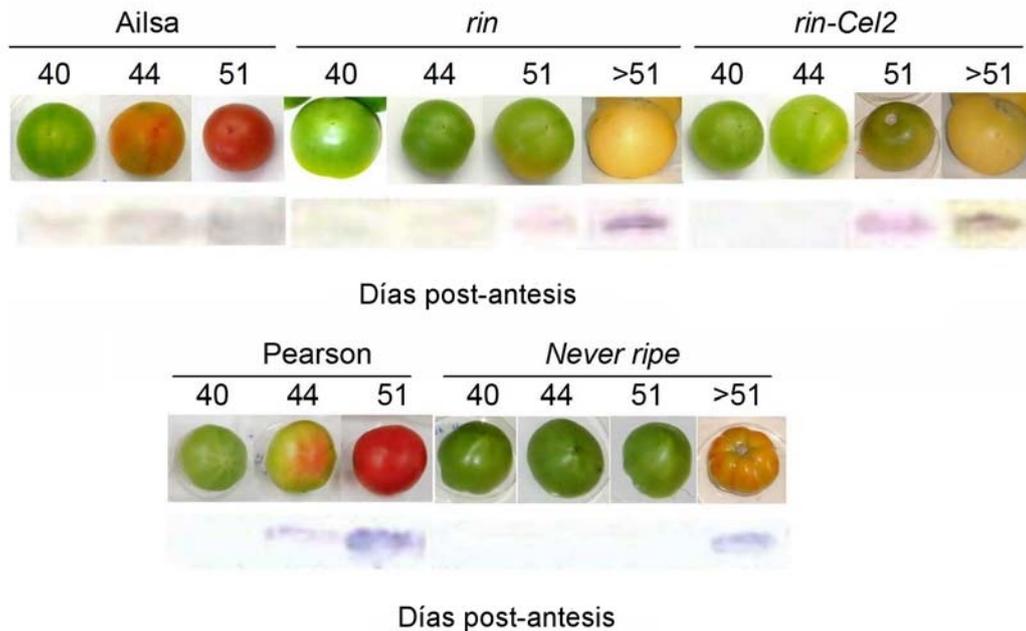


Figura 13: Análisis de la acumulación de la proteína Cel1 en los frutos mutantes de maduración. Se marcaron las flores de los cultivares silvestres Ailsa Craig y Pearson, así como de sus correspondientes mutantes *rin*, *rin-Cel2* y *Nr*, en el momento inmediatamente posterior a la antesis de la flor. Se recolectaron frutos de los cultivares silvestres (frutos control) a varios tiempos post-antesis, correspondientes a distintos estados de maduración. Se recolectaron frutos de los distintos mutantes a los mismos tiempos de desarrollo que los frutos control. Se determinó la abundancia de la proteína Cel1 en el pericarpio de los frutos analizando 60 µg de las proteínas extraídas mediante SDS-PAGE y posterior *western blot*. La igualdad de la carga de proteína se comprobó mediante tinción con Ponceau-S de la membrana, previamente a la detección con anticuerpos policlonales específicos contra Cel1. Las fotos ilustran los patrones de bandas obtenidos, así como el estado de maduración de los frutos en el momento de su recolección.

Los resultados confirmaron la acumulación de Cel1 a lo largo de la maduración en el cultivar Pearson, al igual que ocurre en el cultivar Ailsa Craig (Figura 13). También se demostró la ausencia de la proteína en los frutos mutantes *rin* y *Nr* durante el periodo de maduración normal de sus cultivares control, pero sorprendentemente, se observó la acumulación de Cel1 en estados muy avanzados de maduración. Cel1 empieza a acumularse en los frutos *rin* cuando alcanzan el tiempo correspondiente a la maduración completa (fruto rojo maduro) de los frutos control (Ailsa Craig) y los frutos *Never ripe* empiezan a acumular Cel1 después de superar el tiempo de maduración normal del cultivar control (Pearson). Además de producir una maduración mas temprana con respecto a *rin*, la expresión de *Cel2* en el fondo genético *rin* produjo un adelanto en la acumulación de Cel1, aunque no un incremento de la misma (Figura 13).

Estudios de infección con frutos Pearson y Nr

Al infectar los frutos Pearson y Nr por el sistema de inoculación habitual, no se observaron diferencias en el fenotipo de infección entre ellos (Figura 14). Se observó que en varios de los experimentos realizados los frutos Nr tendían a infectarse menos con respecto a Pearson, pero estas diferencias eran estadísticamente significativas de manera puntual y el resultado no era reproducible en todos los experimentos.

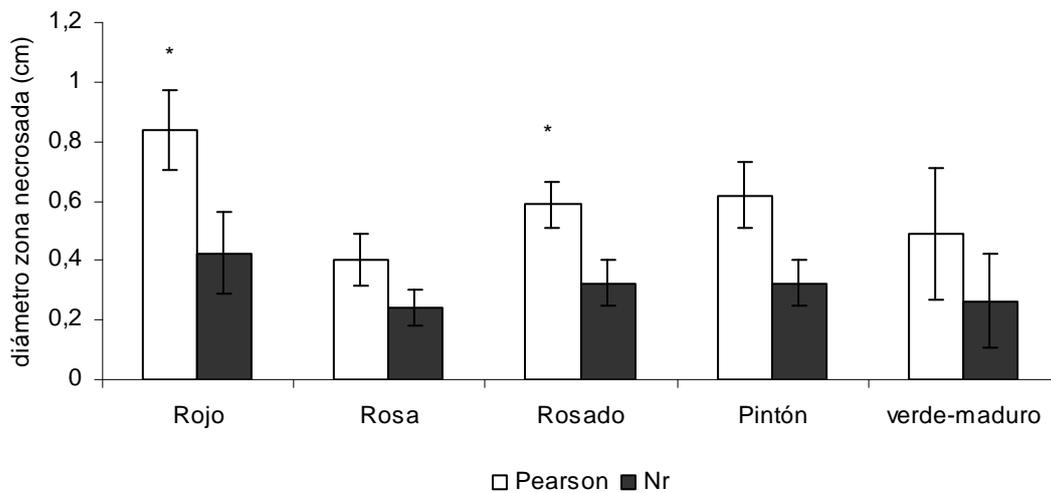


Figura 14: Infección de frutos Pearson y del mutante de maduración Nr. Se recolectaron frutos de varios estados de maduración de las plantas Pearson y frutos correspondientes a los mismos estados de desarrollo y se infectaron previa herida. A las 96 horas se midió el diámetro del halo de necrosis. Los datos representados son la media de las medias de las 4 áreas necróticas de cada fruto. Cada media corresponde a 6 frutos en cada estado de maduración. La figura muestra los resultados de un experimento representativo. Las medias del diámetro del área necrosada de los frutos Pearson estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) de las de los frutos Nr con el mismo tiempo de desarrollo están indicadas mediante un asterisco (*).

Aplicando el sistema de infección por spray no se encontraron diferencias significativas entre los frutos Pearson y Nr (Figura 15).

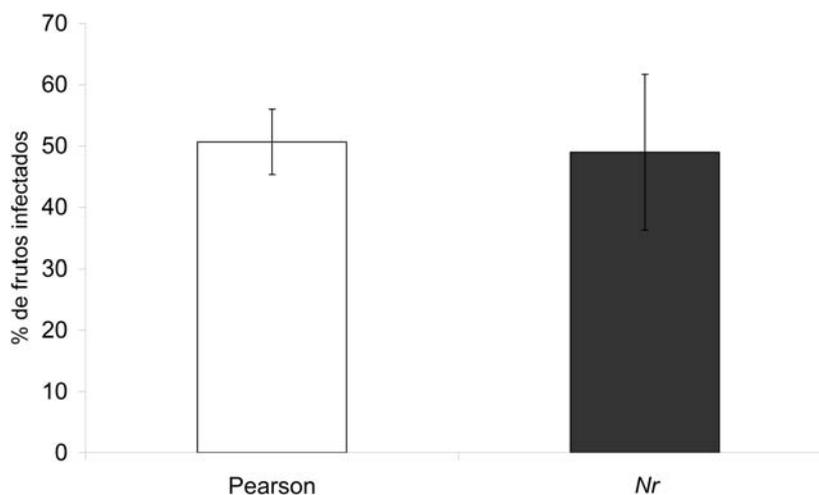


Figura 15: Infección con *B. cinerea* de los frutos Pearson y Nr mediante el sistema de spray. 15 frutos de tomate de cada genotipo fueron inoculados pulverizando con una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 5×10^5 esporas/ml hasta cubrir la superficie del fruto. A los 15 d.p.i. se evaluaron los síntomas de infección. Los datos mostrados son la media de cuatro experimentos independientes. Los datos son expresados en porcentaje de frutos infectados con respecto al total de frutos inoculados.

Estudios de infección con los frutos Ailsa Craig, rin y rin-Cel2

En el caso del mutante *rin*, en el que la expresión de *Cel1* está reducida y no expresa *Cel2*, se obtuvieron resultados interesantes. La expresión de *Cel2* en los frutos *rin-Cel2* provocó un aumento considerable de la susceptibilidad a la infección por *B. cinerea* con respecto a los frutos *rin* y al cultivar silvestre Ailsa Craig (Figura 16).

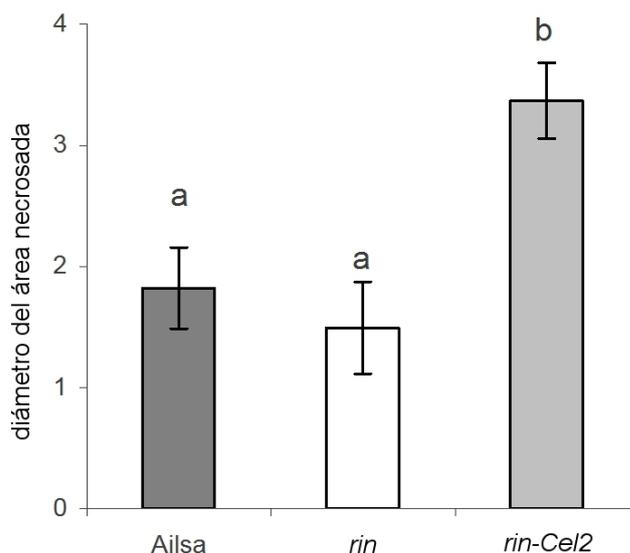


Figura 16: Infección de frutos Ailsa Craig, rin y rin-Cel2. Se recolectaron frutos maduros de tomate cv. Ailsa Craig y frutos del mismo tiempo de desarrollo de las plantas *rin* y *rin-Cel2* y se infectaron previa herida. A las 96 horas se midió el diámetro del halo de necrosis. Los datos representados son la media de las medias de las 4 áreas necróticas de cada fruto. Cada media corresponde a 6 frutos. La Figura muestra los resultados de un experimento representativo. Las medias estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) están indicadas mediante letras.

Aplicando el sistema de infección por spray, no sólo se corroboraron los resultados obtenidos con los frutos *rin-Cel2*, sino que se acentuaron las diferencias de susceptibilidad con respecto a los frutos *rin* (Figura 17).

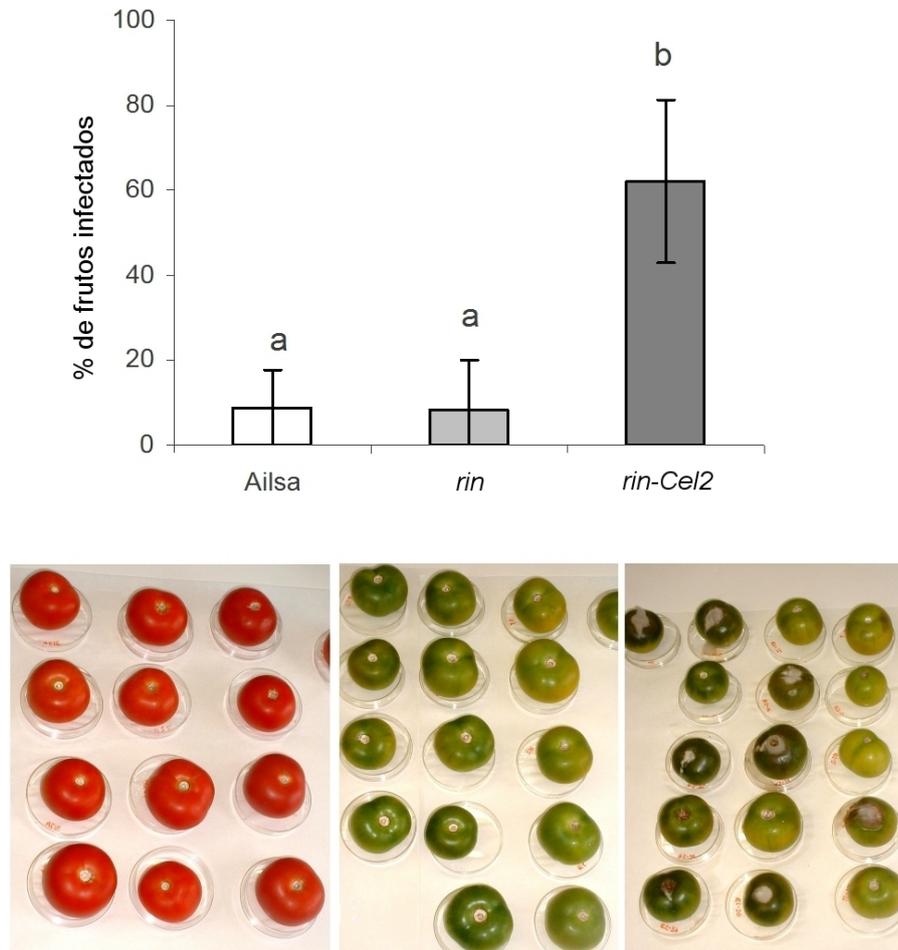


Figura 17: Infección con *B. cinerea* de los frutos Ailsa Craig, *rin* y *rin-Cel2* mediante el sistema de spray. 15 frutos de cada cultivar de tomate fueron inoculados pulverizando tres veces con una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 5×10^5 esporas/ml. A los 15 d.p.i. se evaluaron los síntomas de la infección. El gráfico muestra los datos de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Los datos son expresados en porcentaje de frutos infectados con respecto al total de frutos inoculados. Las fotografías de la parte inferior de la figura ilustran el fenotipo de los frutos en el mismo experimento representativo, al cabo de seis días post-inoculación.

Los resultados obtenidos apoyan la idea de que Cel2 constituye un factor de susceptibilidad frente a *B. cinerea* en el fruto de tomate y que los frutos *rin-Cel2* pueden ser una buena herramienta para estudiar la implicación de las EGAsas en esta interacción.

DISCUSIÓN

Implicación de Cel1 y Cel2 en la interacción de la planta de tomate con *B. cinerea*

El trabajo presentado en este capítulo demuestra que la ausencia de las EGAsas Cel1 y Cel2 disminuye la susceptibilidad de las plantas de tomate al hongo necrótrofo *B. cinerea*. Estudios previos, basados en el patrón de expresión génica, habían sugerido que ambas EGAsas participaban en la maduración del fruto y en la abscisión de la flor (Lashbrook y col., 1994). El análisis de la proteína Cel1, utilizando anticuerpos policlonales específicos, apoyó la implicación de esta EGasa en ambos procesos (González-Bosch y col., 1997; Real y col., 2004). Por otra parte, se había demostrado la expresión diferencial de la proteína Cel1 en fruto de tomate tras la infección con hongos necrótrofos, sugiriendo una interesante relación entre EGAsas, respuestas de defensa y el proceso de maduración del fruto (Real y col., 2004).

Para estudiar la implicación de las EGAsas en la interacción planta-patógeno, se analizó la presencia de la proteína Cel1 en distintas partes de la planta de tomate. Se pudo comprobar que la proteína Cel1 estaba presente también en otros tejidos vegetativos, como las hojas y los tallos. La visualización de la proteína mediante análisis por *western blot* reveló la presencia de varios polipéptidos, tal como se había observado previamente en la zona de abscisión de la flor y en el fruto (González-Bosch y col., 1997; Real y col., 2004). También se comprobó que el patrón de acumulación de Cel1 estaba relacionado con el desarrollo de estos tejidos, observándose su máximo nivel en las hojas totalmente expandidas y en la zona basal del tallo.

La presencia de la proteína Cel1 en hojas de tomate y su patrón de acumulación a lo largo del desarrollo de las mismas, permitió plantear como uno de los objetivos de este trabajo el estudio del papel desempeñado por esta EGasa en la interacción de la planta de tomate frente al hongo necrótrofo *B. cinerea*.

Para llevar a cabo dicho estudio se utilizaron plantas transgénicas, transformadas con los genes de las EGAsas Cel1 y Cel2 en orientación antisentido. Estas plantas fueron obtenidas en el laboratorio del Dr. Alan Bennett y se denominaron Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2 (Lashbrook y col., 1998; Brummell y col., 1999). En primer lugar se comprobó, mediante análisis por *western blot*, que las hojas de las plantas transgénicas Anti-Cel1 y Anti-Cel1-Cel2 no acumulaban la proteína Cel1. No se pudo realizar el mismo tipo de análisis con la proteína Cel2, al no disponer de anticuerpos específicos para dicha EGasa. Sí se pudo demostrar, sin embargo, que la proteína Cel1 se acumulaba en las plantas Anti-Cel2 a un nivel comparable a las

del cultivar silvestre (cv. T5), indicando que no había un efecto compensatorio entre ambas EGAsas.

A partir de estos resultados y de los estudios previos realizados en fruto de tomate, se inició el estudio de la implicación de estas EGAsas en la interacción de la planta con patógenos. Para ello, se puso a punto un sistema de infección reproducible en planta entera con el hongo necrótrofo *B. cinerea*. Este sistema de infección permite una aproximación más *in vivo* de la interacción, comparado con los estudios habituales que se suelen realizar en hoja aislada o en discos de tejido. Utilizando este sistema se comprobó que las plantas transgénicas Anti-Cel1-Cel2 eran significativamente menos susceptibles a la infección y que presentaban un fenotipo característico, consistente en un área de necrosis menor y bien delimitada. La mayor resistencia frente a *B. cinerea* mostrada por las plantas de tomate que carecen de las EGAsa Cel1 y Cel2 permite proponer a estas EGAsas como factores de susceptibilidad frente a dicho patógeno. Las plantas transgénicas que carecen de una de las EGAsas (plantas Anti-Cel1 y Anti-Cel2) no mostraron diferencias significativas de susceptibilidad con respecto a las plantas control (cv. T5). Estos resultados indican que se requiere la ausencia de ambas EGAsas para que se produzca una variación significativa en la respuesta de la planta frente a *B. cinerea*.

Al inicio de este trabajo la mayor parte de la información disponible sobre el papel desempeñado por enzimas hidrolíticas de pared en las interacciones planta-patógeno hacía referencia a aquellas consideradas como proteínas relacionadas con patogénesis (PRs), como son las β -1,3-glucanasas y las quitinasas (van Loon y col., 2006a). Se había descrito, sin embargo, que en *Arabidopsis* el gen *PMR6*, que codifica una pectatoliasa, era un factor de susceptibilidad a *Erysiphe cichoracearum* (Vogel y col., 2002). La resistencia observada en mutantes de dicho gen parecía estar relacionada con una reducción en la disponibilidad de nutrientes para el patógeno o con una menor eficiencia en la penetración del mismo, probablemente debido al incremento en el contenido en pectinas de la pared. La resistencia mediada por mutaciones en el gen *pmr6* constituía una nueva forma de resistencia frente a patógenos, basada en la pérdida de un gen necesario durante una interacción compatible, pero que no requería la activación de las principales rutas de defensa de las plantas. Los resultados eran, por tanto, consistentes con la idea de que la composición de los polisacáridos de la pared celular constituía un factor determinante en la interacción planta-patógeno.

Interferencia de Cel1 y Cel2 en mecanismos de respuesta de la planta de tomate frente a *B. cinerea*

Una vez comprobado que la ausencia de las EGasas Cel1 y Cel2 reducía la susceptibilidad de las plantas transgénicas Anti-Cel1-Cel2 frente a *B. cinerea*, se procedió a determinar si dicho fenotipo estaba asociado con cambios en los principales mecanismos de respuesta de las plantas. Para ello se llevó a cabo un análisis microscópico de la zona de expansión de la necrosis y del tejido colindante. Utilizando un método de tinción específica, se pudo comprobar que las plantas de tomate acumulaban de forma local el polisacárido de defensa calosa, en respuesta al ataque por *B. cinerea*. Asimismo, se demostró que en las plantas Anti-Cel1-Cel2 se incrementaba significativamente el depósito de calosa en torno al sitio de infección, con respecto a las plantas control. Las plantas Anti-Cel1 y Anti-Cel2, sin embargo, no mostraron diferencias significativas en la acumulación del polímero, con respecto a las plantas control (cv. T5). Hay que destacar que la inducción de una mayor acumulación de calosa sólo se produjo al infectar con *B. cinerea*, por lo que la ausencia de las EGasas produciría un efecto de *priming* en la planta de tomate.

En conjunto, estos resultados indican que la deposición de calosa constituye un mecanismo de respuesta frente a este hongo necrótrofo en tomate, y que una mayor acumulación de la misma contribuiría a la mayor resistencia presentada en las plantas transgénicas. El tratamiento de las plantas con 2-desoxi-D-glucosa (DDG), un inhibidor de la síntesis de calosa, incrementó la susceptibilidad de las plantas control frente a *B. cinerea*, demostrando que la deposición de calosa forma parte de las defensas inducibles de la planta de tomate contra necrótrofos. Asimismo, la ausencia de deposición de calosa anuló la resistencia incrementada en las plantas Anti-Cel1-Cel2, mostrando un fenotipo de infección similar al de las plantas control, confirmando así que la actividad de las EGasas está relacionada con este mecanismo de defensa. Recientemente se había demostrado que en *Arabidopsis* la deposición de calosa constituía un mecanismo esencial contra necrótrofos como *Alternaria brassicicola* (Ton y col., 2004; Flors y col., 2005). En tomate se disponía de datos procedentes de plantas deficientes en una β -1,3-glucanasa, que mostraban una mayor resistencia al virus del mosaico del tabaco (TMV), asociada con un aumento en la acumulación de calosa en los plasmodesmos (Iglesias & Meins, 2000).

Por otra parte, se analizó el efecto producido por la ausencia de ambas EGasas en las principales rutas de señalización relacionadas con las defensas de las plantas.

Para ello se determinaron los niveles de expresión de genes marcadores de las rutas dependientes de ácido salicílico (SA) y de ácido jasmónico (JA).

Se había descrito que la ruta del SA participaba en la interacción con *B. cinerea* en tomate (Achuo y col., 2004). En nuestro sistema experimental se comprobó que la expresión del gen *PR1* se incrementaba en respuesta a la infección con *B. cinerea* en tomate, siendo este resultado consistente con la implicación de la ruta del SA en esta interacción planta-patógeno. En las plantas transgénicas Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2, se produjo un incremento adicional en la acumulación del transcrito de *PR1*, indicando que la ausencia de las EGAsas afecta a la expresión de genes relacionados con esta ruta de señalización.

Similarmente a *PR1*, el análisis de la expresión del marcador de la ruta de JA, *LoxD*, reveló que este transcrito se acumula a medida que avanza la infección, demostrando la implicación de la ruta mediada por JA en la interacción tomate-*B. cinerea*. La participación de esta ruta en dicha interacción había resultado controvertida, ya que en unas condiciones experimentales se había descrito que el mutante de tomate *def1*, deficiente en JA, resultaba más susceptible a *B. cinerea* (Díaz y col., 2002). Sin embargo, otros investigadores no observaron diferencias entre este mutante y el control (Audenaert y col., 2002b), aunque en este segundo estudio los experimentos se llevaron a cabo utilizando hojas cortadas de plantas de más tiempo de crecimiento. Por otra parte, y al igual que *PR1*, la expresión de *LoxD* se incrementó en todas las plantas transgénicas antisentido.

El hecho de que la ausencia de las EGAsas Cel1 y Cel2 produzca un incremento en la expresión de genes marcadores de las rutas principales de resistencia a patógenos, apoya la relación existente entre las EGAsas y los mecanismos de respuesta frente a patógenos.

Implicación de Cel1 y Cel2 en la interacción del fruto de tomate con *B. cinerea*

El estudio del papel de las EGAsas en la interacción con el patógeno se extendió al fruto de tomate. Los frutos transgénicos Anti-Cel1, Anti-Cel2 y Anti-Cel1-Cel2 no mostraron diferencias significativas en la susceptibilidad a *B. cinerea*, con respecto a los frutos control. El análisis por *western blot* de la proteína Cel1 en dichos frutos transgénicos puso de manifiesto el bajo nivel de acumulación de dicha proteína en el pericarpio de los frutos procedentes de las plantas control (cv. T5), ya que no se pudieron detectar los polipéptidos correspondientes en dicho tejido. Cel1, sin embargo, sí se acumulaba visiblemente en el lóculo del fruto, lo que permitió confirmar la ausencia de la proteína en los frutos Anti-Cel1 y en los frutos Anti-

Cel1-Cel2. El hecho de que Cel1 fuese tan poco abundante en el pericarpio del fruto, que es el tejido donde se produce la infección, podría ser la causa de que no se detectasen diferencias de susceptibilidad entre los frutos transgénicos y los frutos control. Este resultado puso de manifiesto que, los frutos transgénicos antisentido no eran la mejor herramienta para estudiar la implicación de estas EGAsas en la infección del fruto de tomate.

Dado que el sistema de infección en fruto requería una herida previa, se consideró que este hecho podría enmascarar las posibles diferencias de respuesta existentes entre los frutos transgénicos y los controles. Para descartar esta posibilidad se puso a punto un sistema de infección basado en la inoculación mediante pulverización de las esporas de *B. cinerea*. Este sistema había sido previamente utilizado en la inoculación de otros patógenos en fruto de tomate (Cooper y col., 1998). Utilizando este sistema se observaron diferencias de susceptibilidad a *B. cinerea* entre frutos de distintos cultivares de tomate, que no eran patentes en la infección llevada a cabo con el sistema de herida. Sin embargo, en estas condiciones los frutos de las plantas transgénicas antisentido tampoco presentaron diferencias significativas en la infección, con respecto a los frutos control (cv. T5).

La ausencia de diferencias en el fenotipo de infección en los frutos transgénicos podría deberse, en parte, al bajo nivel de acumulación de la proteína Cel1 en el pericarpio de los frutos del cultivar utilizado para obtener las plantas transgénicas. Sin embargo, también podría reflejar la existencia de diferencias en los mecanismos de defensa frente a patógenos entre la planta y el fruto. Hay que tener en cuenta que los mecanismos por los cuales el fruto de tomate responde a una infección fúngica no están bien establecidos y podrían ser diferentes a los que se han descrito en la planta.

Como herramienta alternativa a los frutos antisentido, se estudió el proceso de infección con *B. cinerea* en frutos mutantes deficientes en la maduración. Los mutantes utilizados fueron *Never ripe (Nr)* y *ripening inhibitor (rin)*, en los que se había demostrado la baja acumulación de los transcritos de *Cel1* y de *Cel2* (González-Bosch y col., 1996). El resultado más interesante de ese estudio previo fue comprobar la ausencia del RNA mensajero de *Cel2* en los frutos *rin*, mostrando un comportamiento similar al gen de la poligalacturonasa (PG) de tomate (Dellapenna y col., 1989; Yen y col., 1995). La ausencia del transcrito de *Cel2* sugirió la posible correlación entre la deficiencia en la actividad de esta EGasa y la maduración anómala de los frutos mutantes. Para comprobar esta hipótesis se transformó el mutante *rin* con el gen *Cel2*, al que nos referiremos como *rin-Cel2* (Dr. Alan Bennett, datos no publicados).

Estos frutos presentaban un fenotipo similar al de los frutos *rin*, siendo todavía deficientes en el proceso de maduración. Sin embargo, se observó que la expresión de *Cel2* en el fondo genético *rin* aceleraba tanto el ablandamiento, como el cambio de color, con respecto a lo observado en los frutos *rin*.

El análisis de la proteína Cel1 demostró que se produce un retraso en su acumulación en el pericarpio de los frutos *rin* y *Nr*, a lo largo del periodo normal de maduración de los frutos silvestres (cv. Ailsa Craig y cv. Pearson, respectivamente). Este resultado es consistente con la baja acumulación del transcrito de *Cel1*, observada previamente en los frutos de ambos mutantes (González-Bosch y col., 1996). La acumulación de Cel1 en los frutos *rin-Cel2* fue similar a la observada en los frutos *rin*, por lo que la expresión de esta EGasa en el mutante no modificó los niveles de Cel1. Este resultado, añadido a lo observado en las plantas transgénicas Anti-Cel2, refuerza la idea de que los genes *Cel1* y *Cel2* están sometidos a distintos mecanismos de regulación (González-Bosch y col., 1996).

Un resultado interesante, que se obtuvo del análisis de estos mutantes, fue que tras madurar en la planta durante un largo periodo de tiempo, los frutos acumularon la proteína Cel1 en todos los casos (*Nr*, *rin* y *rin-Cel2*). Estos resultados demuestran que la proteína Cel1 finalmente escapa de la regulación negativa a la que estaba sometida a lo largo de la maduración, lo que proporciona nuevos datos sobre la compleja regulación de las EGAsas en estos mutantes de maduración.

Puesto que el interés de estudiar estos mutantes era analizar el posible papel de las EGAsas en la patogénesis del fruto, se infectaron sus frutos con *B. cinerea*. Se comprobó que los frutos *Nr* mostraban una susceptibilidad similar a la de los frutos de su cultivar silvestre (cv. Pearson), confirmando los resultados obtenidos previamente en plantas *Nr* (Díaz y col., 2002).

Los frutos *rin* fueron ligeramente más resistentes a la infección por *B. cinerea* que los frutos del cultivar silvestre (cv. Ailsa Craig), siendo este resultado consistente con la reducción de las EGAsas Cel1 y Cel2 en estos frutos. No obstante, el resultado más interesante fue que la expresión de Cel2 en el mutante *rin* incrementó la susceptibilidad de los frutos al hongo. Estos resultados demuestran la implicación de las EGAsas en la interacción con el patógeno en el fruto de tomate, al menos, como un factor de susceptibilidad. La ausencia constitutiva de la expresión de una de las EGAsas, como ocurre en el mutante *rin*, no parece ser suficiente para afectar de forma significativa a la susceptibilidad basal del fruto a *B. cinerea*. Sin embargo, la presencia de Cel2 en este mutante facilita la expansión del patógeno. Aparentemente, el avance del hongo debe ser favorecido por la actividad hidrolítica de Cel2, lo cual podría deberse a un incremento en el ablandamiento del fruto, que favorecería el avance del patógeno.

Muy recientemente se ha comprobado que la expresión simultánea en orientación antisentido de una poligalacturonasa y una expansina incrementan la resistencia frente a la infección por *B. cinerea* en frutos de tomate, apoyando el papel de las enzimas de pared celular en los mecanismos de respuesta del fruto (Cantu y col., 2008).

Perspectivas futuras derivadas de la implicación de Cel1 y Cel2 en la interacción tomate-*B. cinerea*

En conjunto, los resultados obtenidos en este capítulo permiten concluir que existe una conexión entre las EGAsas Cel1 y Cel2 y la susceptibilidad del tomate (*Solanum lycopersicum*) al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea*. Serán necesarios estudios adicionales para verificar si la ausencia de las EGAsas produce cambios, tanto en la composición de la pared celular, como en la regulación de los mecanismos de defensa, que retrasen el crecimiento del hongo. Por otra parte, será interesante comprobar qué cambios se han producido en la pared celular como consecuencia de la ausencia de ambas EGAsas, ya que se dispone de poca información sobre la especificidad de sustrato de estas enzimas en condiciones fisiológicas. Actualmente los sustratos potenciales se consideran el xiloglucano y la celulosa no cristalina (Cosgrove, 2005; Ohmiya y col., 2000). En el último caso, los autores aportaron evidencias indirectas que sugerían que las EGAsas PopCel1 y PopCel2 de álamo (*Populus alba*) podrían degradar las regiones no cristalinas de las microfibrillas de celulosa, liberando así los xiloglucanos atrapados. Teniendo en cuenta el aparentemente amplio rango de sustratos potenciales para las EGAsas, una posible explicación para el incremento en la acumulación de calosa producido tras la infección en las plantas Anti-Cel1-Cel2 es que la calosa fuese sustrato de las EGAsas, debido a una actividad O-glicosil de estas enzimas, que podría tener como función evitar la acumulación de dicho polisacárido en ausencia del ataque de un patógeno.

Otra hipótesis, quizá más especulativa, pero igualmente interesante, es que la ausencia de la actividad enzimática de las EGAsas pudiera ser percibida por la planta como una señal de alteración en la estructura y funcionamiento normal de la pared celular, lo que activaría la batería de defensas de la planta, con objeto de hacer frente a una posible situación de estrés. En tal caso, los productos de la actividad de las EGAsas podrían actuar como señales del metabolismo normal de la pared celular, que reprimirían la activación de los mecanismos de defensa.

En los últimos años se han aportado muchas evidencias del papel de la pared en la señalización celular. En diversos trabajos se ha demostrado la implicación de

diferentes componentes y actividades enzimáticas asociadas a la pared celular en diversas interacciones planta-patógeno. El mutante de *Arabidopsis sma4* muestra una elevada susceptibilidad a la cepa avirulenta de la bacteria hemibiótrofa *Pseudomonas syringae* pv. Tomate DC3000 pero, en cambio, es muy resistente al necrótrofo *Botrytis cinerea*. El gen *SMA4* codifica la proteína LACS2, un miembro de la familia de las Acil-CoA sintetetasas de ácidos grasos de cadena larga, implicada en la biosíntesis de cutina. Los autores concluyeron que la cutina de la planta, o la estructura de la cutícula, podrían desempeñar un papel clave, tanto en la patogénesis de *B. cinerea*, como en la tolerancia a otros estreses bióticos y abióticos (Tang y col., 2007). Paralelamente, experimentos llevados a cabo con el mutante *bre1* de *Arabidopsis*, resistente a *B. cinerea*, revelaron que una cutícula permeable no sólo no facilita la entrada a hongos patógenos en general sino que, sorprendentemente, detiene el avance de *B. cinerea*. El gen *BRE1* fue identificado como la sintetasa de Acil-CoA de cadena larga *LACS2*, asociada previamente con el desarrollo de la cutina, componente principal de la cutícula (Bessire y col., 2007). Por otra parte, se ha caracterizado un cultivar de tomate que presenta una maduración normal del fruto, pero con una mínima tasa de ablandecimiento del mismo, denominado "Delayed Fruit Deterioration" (DFD). Los autores asociaron ese fenotipo a un incremento en el grosor de la cutícula del pericarpio en el fruto maduro y además, observaron que los frutos DFD eran más resistentes a *B. cinerea* y a otros patógenos oportunistas, comparados con el cultivar Ailsa Craig, a menos que la cutícula sea dañada mediante una herida previa a la inoculación (Saladié y col., 2007). Estas observaciones reflejan cómo un componente de pared puede constituir un factor de resistencia o de susceptibilidad, dependiendo del sistema planta/fruto-patógeno de estudio.

Se ha descrito que un denominador común en todas las especies hospedantes de *B. cinerea* es el alto contenido en pectinas de la pared celular. La sobreexpresión de inhibidores de la pectín metil esterasa (PME) en plantas de *Arabidopsis*, condujo a una disminución en dicha actividad enzimática en las plantas transgénicas y, como consecuencia de ello, a un mayor grado de esterificación en sus pectinas. Estas plantas resultaron ser más resistentes a *B. cinerea*, lo cual se relacionó con la incapacidad del hongo para crecer en pectinas esterificadas (Lionetti y col., 2007).

Recientemente se ha demostrado también que mutaciones en las celulosa sintetasas confieren resistencia a la bacteria fitopatógena de suelo *Ralstonia solanacearum* y al hongo necrótrofo *Plectosphaerella cucumerina* en *Arabidopsis* (Hernández-Blanco y col., 2007). El estudio realizado con dobles mutantes demostró que esta resistencia era independiente de la señalización mediada por SA, JA o ET. El análisis transcriptómico reveló la inducción de un grupo de genes

responsables de la respuesta mediada por el ácido abscísico y de genes que codificaban antibióticos y enzimas implicadas en la síntesis y activación de metabolitos secundarios antimicrobianos. Estos resultados, junto con el hecho de que mutantes defectivos en enzimas reguladoras de la síntesis de metabolitos secundarios fuesen más susceptibles a *R. solanacearum*, permitió proponer que las células debían interferir en la síntesis de metabolitos antimicrobianos, siendo éste el posible mecanismo por el que detenían el crecimiento de este patógeno. Estos resultados demostraron que una alteración en la estructura de la pared celular secundaria, causada por la inhibición de la síntesis de celulosa, producía la activación de rutas de defensa independientes de la señalización mediada por SA, JA o ET. Esto apoyaba la hipótesis de la existencia de un sistema de percepción de la pared celular en plantas, similar al que existe en levadura, formado por proteínas integrales de membrana que actúan como sensores de superficie y responden a diversos estreses ambientales (Merchan y col., 2004).

Es interesante destacar que la pared celular en las plantas presenta una gran complejidad, tanto en su composición, como en su estructura. Diversos autores han sugerido que dicha complejidad no se justifica con la función estructural o de barrera física que desempeña la pared celular, sino que podría ser la base de un sistema de señalización molecular latente que estaría implicado, entre otras cosas, en la defensa de la planta (Vorwerk y col., 2004). Por otra parte, como ya se ha comentado previamente, múltiples evidencias respaldan el papel de los oligo- α -galacturonidos (OGAs) y de otros oligosacáridos de pared, como mensajeros que median un gran número de procesos que tienen lugar en la planta, incluyendo la respuesta a patógenos (Vorwerk y col., 2004). Resultados muy recientes indican que el tratamiento con OGAs induce resistencia frente a *B. cinerea* en *Arabidopsis*, de forma independiente de la señalización mediada por SA, JA o ET (Ferrari y col., 2007). Esto sugiere que durante el ataque del patógeno se liberarían elicitores de la pared celular, que contribuirían a la resistencia basal frente a hongos fitopatógenos, mediante una ruta de transducción que también es activada por patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs, MAMPs o MIMPs).

La propuesta de que la actividad de las β -1,4-endoglucanasas (EGasas) forme parte de la compleja red de señalización de la pared celular y del metabolismo que opera en la interacción planta-patógeno, supone el punto de partida de un interesante campo de investigación.

CAPITULO II

Búsqueda de compuestos antifúngicos de baja toxicidad y de inductores de las defensas naturales de las plantas en el sistema tomate-*Botrytis*

INTRODUCCIÓN

Estrategias alternativas para el control de *Botrytis cinerea*

Durante mucho tiempo *B. cinerea* ha sido un problema para los agricultores en diversas partes del mundo. Aunque el control químico se ha utilizado como una práctica habitual durante años, el uso masivo, continuado y en algunos casos, poco controlado de los fungicidas de síntesis ha generado la aparición de cepas resistentes a estos productos químicos y a otros de estructura similar (Rosslénbroich & Stuebler, 2000; Leroux y col., 2002). También ha contribuido a la contaminación de los suelos y de las aguas, así como al incremento de residuos en la fruta, con el consiguiente riesgo para la salud humana (Unnikrishnan & Nath, 2002) y el medio ambiente (Knight y col., 1997). Por ello, es importante buscar compuestos con propiedades antifúngicas que sean eficaces, sin resultar tóxicos y/o compuestos que puedan ofrecer una alternativa a los clásicos fungicidas para el control de *B. cinerea*. El objetivo del estudio que se va a describir en este capítulo consiste en intentar proporcionar alternativas basadas en la búsqueda de nuevos compuestos fungicidas, preferentemente de origen natural o derivados ellos, así como en la protección de las plantas y sus frutos mediante la inducción de las respuestas defensivas.

Uso de compuestos antifúngicos de baja toxicidad

El uso de compuestos de baja toxicidad es una alternativa que se está utilizando ya, en un intento de controlar la podredumbre gris en campo y en postcosecha.

La fusapirona es un metabolito antifúngico purificado de cultivos de *Fusarium semitectum* aislados del suelo. Se ha observado que inhibe significativamente la germinación de esporas de *B. cinerea* y muestra un efecto curativo en uva. Su baja toxicidad, tanto para animales como para plantas, ha promovido su uso en el control de *B. cinerea* en uva y en otros cultivos (Altomare y col., 1998; Altomare y col., 2000).

La aureobasidina A (AbA) es un antifúngico producido por *Aureobasidium pullulans* (cepa R106) que resulta efectivo contra un amplio rango de hongos y protozoos (Takesako y col., 1993; Sonda y col., 2005). Su diana es la inositol fosforilceramida sintasa, un enzima esencial para la biosíntesis de esfingolípidos en los hongos, pero ausente en los mamíferos (Dickson y col., 2006; Liu y col., 2007). De hecho, el Aba no muestra apenas efectos tóxicos sobre ratones (Takesako y

col., 1993) y recientemente, se ha comprobado su efectividad contra varios hongos fitopatógenos, incluyendo *P. digitatum*, *P. italicum*, *P. expansum*, *B. cinerea* y *Monilinia fructicola* (Liu y col., 2007). Su aplicación por baño en fresa redujo la podredumbre gris en alrededor de un 40% (Liu y col., 2007).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) tienen un amplio espectro de actividad contra bacterias, levaduras, hongos y virus y son componentes importantes de un mecanismo inmunitario ancestral en la evolución, encontrándose en numerosos organismos desde los insectos a los humanos (Zasloff, 2002; Brogden, 2005). Se cree que los AMPs presentan un bajo riesgo en la aparición de resistencias y han sido propuestos como nuevos agentes antimicrobianos. Se ha identificado un grupo de hexapéptidos con propiedades antifúngicas denominados PAFs, que inhiben el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de fitopatógenos fúngicos. Muy recientemente se ha comprobado la acción antimicrobiana *in vitro* de estos PAFs sobre *M. grisea*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* (Muñoz y col., 2007).

El propóleo es una resina natural que se obtiene de las coníferas que tiene actividad antibacteriana y antifúngica y se ha observado que inhibe a *P. expansum* y a *B. cinerea* (Ozcan, 1999).

También se ha observado que algunos extractos de plantas, obtenidos por medio de disolventes orgánicos, tienen acción inhibitoria contra algunos hongos patógenos (Kapoor, 1997; Radha y col., 1999; Rana y col., 1999). De un extracto con diclorometano de las partes aéreas de *Chenopodium procerum* se aislaron diversos compuestos, entre ellos una flavonona y un sesquiterpeno que inhibieron el crecimiento de *Cladosporium cucumerinum* (Bergeron y col., 1995). Por otra parte, varios compuestos fenólicos inhibieron el crecimiento de *Botryodiplodia theobromae*, siendo el ácido clorogénico el que presentaba mayor actividad inhibitoria *in vitro*.

Los ácidos fenólicos son componentes importantes del sistema defensivo de las plantas y son parte de los compuestos conocidos como fitoanticipinas. El ácido caféico inhibe en medio líquido la producción de cutinasa en *B. cinerea* (Bostock y col., 1999).

El resveratrol es el compuesto estilbenico mayoritario identificado en la uva tras la infección por *B. cinerea* (Langcake, 1981, Montero y col., 2003, Paul y col., 1999). Este compuesto reduce tanto la germinación de esporas como el crecimiento del micelio de *B. cinerea*, provocando cambios citológicos tales como la generación de tubos germinativos secundarios y terciarios, la aparición de granulaciones citoplasmáticas, la retracción del protoplasma y la formación de tubos germinativos curvados (Adrian y col., 1997). La aplicación de resveratrol en uvas cosechadas las

protege del deterioro sufrido por infecciones fúngicas locales durante el almacenamiento (Ureña, 2003).

Entre los flavonoides se ha observado que la sakuranetina, aislado de la grosella negra (*Ribes nigrum*), inhibe la germinación de *B. cinerea* (Grayer & Harbone, 1994). El aceite de grosellero negro está incluido en la lista comunitaria de sustancias activas que no se consideran como productos fitosanitarios (Reglamento CE 647/2007).

La α -tomatina, la principal saponina del tomate, también afecta al crecimiento de *B. cinerea* (Osbourn, 1996 a y b). La acción tóxica de las saponinas sobre los hongos está asociada con la habilidad de estos compuestos para acomplejarse con los esteroides de la membrana plasmática del hongo, causando la formación de poros en la membrana (Keukens y col., 1995).

Las cucurbitacinas son triterpenoides tetracíclicos que protegen al pepino contra la infección por *B. cinerea* inhibiendo la producción de lacasa en el hongo (Barnun & Mayer, 1990). Por otra parte, los compuestos 5,7-dihidroxi-3,8-dimetoxiflavona y el ácido 3 β -hidroxi-kaurenoico, aislados de exudados resinosos de algunas especies del género *Pseudognaphalium*, mostraron toxicidad contra *B. cinerea* (Cotoras y col., 2001). En un trabajo posterior los mismos autores observaron que el ácido 3 β -hidroxi-kaurenoico retrasaba la germinación y el desarrollo de *B. cinerea* y protegía a las plantas de tomate frente a este patógeno. Los autores sugirieron que éste alteraba a la permeabilidad de la membrana del hongo, (Cotoras y col., 2004).

Entre las numerosas sustancias con potencial actividad antimicrobiana también están los glucosinolatos. En particular, el Allyl isotiocianato (AITC) es un componente natural de la mostaza y del rábano con actividad antimicrobiana (Delaquis & Mazza, 1995). Este compuesto volátil puede ser utilizado en el envasado con atmósferas modificadas o como tratamiento gaseoso antes del almacenamiento de peras (Mari y col., 2002).

El ácido acético es un intermediario metabólico que existe en la mayoría de los frutos (Nursten, 1970). Sholberg y Gaunce (1995), mostraron que la administración por vía aérea de ácido acético, a bajas concentraciones, era muy efectiva contra las esporas de *B. cinerea* sin efectos fitotóxicos sobre las manzanas. Generalmente la forma no disociada de los ácidos carboxílicos es mucho más efectiva que la forma disociada (Eklund, 1983), ya que, al no tener carga, puede difundir mejor a través de la membrana plasmática de los microorganismos. En el interior de la célula se encontraría con un pH más alto y el ácido se disociaría y se acumularía. Por otra parte, al desprotonarse acidificaría el citosol, lo que inhibiría muchas funciones metabólicas (Piper y col., 2001). Se ha demostrado que el ácido acético es un buen fungicida para uso comercial en albaricoque y ciruelas (Liu y col., 2002), uvas

(Sholberg & Gaunce, 1995) y cerezas (Chu y col., 1999). El ácido sórbico y sus sales solubles en agua, especialmente el sorbato potásico, son conservantes alimentarios comunes. Los sorbatos inhiben ciertas bacterias, levaduras y hongos relacionados con los alimentos (Sofos & Busta, 1981; Sofos, 1993). De hecho, el sorbato potásico fue comercializado para retrasar el pudrimiento postcosecha de cítricos, pero su uso no se hizo popular dado que su eficacia a veces era baja y sólo retrasaba la podredumbre verde causada por *P. digitatum* y *P. italicum* (Palou y col., 2002). Un estudio muy reciente muestra que el sorbato potásico aumenta la eficacia de varios fungicidas sintéticos comerciales sobre la germinación de *P. digitatum* y que junto al bicarbonato sódico actúan sinérgicamente (Smilanick y col., 2008). Los autores concluyen que la actividad antimicrobiana del sorbato potásico es mayor cuando se encuentra en estado no disodiado (ácido sórbico). Esta clase de compuestos altera la permeabilidad de la membrana (Holyoak y col., 1999) y suelen ser fungiestáticos en lugar de fungicidas, debido a que algunos hongos tienen la capacidad de catabolizarlos en productos finales inactivos (Baird-Parker, 1980).

También se ha demostrado que el bicarbonato sódico controla parcialmente la podredumbre verde causada por *P. digitatum* en cítricos (Larrigaudière y col., 2002; Smilanick y col., 1999) y que su mezcla con otros fungicidas de origen sintético mejora la eficacia de éstos, permitiendo reducir las cantidades empleadas (Smilanick y col., 2008). Por otra parte, puede utilizarse en combinación con la lucha biológica o con agua caliente para mejorar su eficacia (Larrigaudière y col., 2002). Sin embargo, su aplicación es algo problemática debido a la alta conductividad y pH y a la toxicidad del sodio para las plantas.

Recientemente se ha medido la eficacia de una serie de antraquinonas sintéticas contra *Botrytis cinerea* (Mendoza y col., 2005). La 4,4-dimetilantraceno-1,9,10 (4H)-triona, consigue la inhibición total de la germinación de las esporas tras 7 horas de incubación. Este compuesto no produce peroxidación lipídica ni formación de ROS, pero es capaz de permeabilizar las membranas incrementando la concentración de fósforo en el medio extracelular (Mendoza y col., 2005).

Inducción de las respuestas de las plantas

Como se ha descrito en la introducción general de la presente tesis, las plantas resisten el ataque de los patógenos mediante sistemas de defensa constitutivos e inducibles. Además de los mecanismos de defensa basales, las plantas son capaces de desarrollar lo que se denomina una resistencia inducida (RI), que es un estado de mayor capacidad de respuesta defensiva que se produce cuando la planta es estimulada adecuadamente (Van Loon y col., 1997; Van Loon y col., 1999) y que le confiere la capacidad de resistir subsiguientes ataques por patógenos. La estimulación de mecanismos de respuesta ha emergido como una alternativa plausible al uso de fungicidas. Hay varios trabajos que describen la eficacia de la resistencia inducida en campo (Vallad & Goodman, 2004). Por otra parte, se ha comprobado que la combinación de inductores con fungicidas o con agentes de lucha biológica, puede proporcionar un control efectivo de las enfermedades de las plantas, especialmente en situaciones donde es difícil conseguir un control aceptable. Hay varios trabajos que combinan el análogo del ácido salicílico ASM con fungicidas sintéticos (Leskovar & Kolenda, 2002; Ryley y col., 2003) y con agentes biológicos y bactericidas (Gent & Schwartz, 2005).

La resistencia inducida puede ser estimulada por agentes bióticos y abióticos, tanto a nivel local como a nivel sistémico, es decir, en otras zonas de la planta que no han sido tratadas (Walters & Boyle, 2005). Esta RI raramente produce la completa inhibición del patógeno, sino que suele conferir cierta protección, por ejemplo, reduciendo el número y el tamaño de las lesiones necróticas (Kuc, 1982). La expresión de esta RI no requiere la existencia de genes de resistencia específicos contra el patógeno, sino que se activan los mismos mecanismos implicados en las otras formas de resistencia a patógenos de la planta (Heath, 1998). Tras la aplicación de un tratamiento inductor, los mecanismos de defensa pueden ser activados directamente o sólo tras la inoculación con una patógeno (Walters & Boyle, 2005), lo que se conoce como el fenómeno de *priming*.

Inductores

A lo largo de los años se han descrito varios compuestos, tanto de origen biológico como de origen sintético, capaces de proteger a las plantas de varias enfermedades, sin mostrar un efecto directo sobre el patógeno. Estas sustancias son denominadas inductores, porque su eficacia se basa en la inducción de los mecanismos de resistencia de las plantas tratadas. Los progresos obtenidos con estos compuestos indican que podrían incluirse en la lucha integrada contra

patógenos y lo que es más importante, promover en mucha menor medida que los fungicidas la aparición de cepas resistentes (Gozzo, 2003).

A continuación se describen algunos de los inductores conocidos, incluyendo aquellos que confieren protección frente a *B. cinerea*. Los más estudiados son aquellos que mimetizan la estructura y modo de acción de las hormonas SA, JA y ET.

Análogos del ácido salicílico

Los inductores químicos que han sido más investigados son aquellos que interfieren en la ruta del SA, como los análogos estructurales del SA, el ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) y el 1,2-Bencisotiazol,3-(2-propen-1-iloxi)-,1,1-dioxido (BTH), también conocido como acibenzolar-S-metil (ASM). Ni el INA ni el BTH poseen actividad antimicrobiana *in vitro* y ambos activan los mismos genes que se inducen en la respuesta dependiente de SA (Delaney y col., 1995). El INA protege a varias monocotiledóneas y dicotiledóneas frente a un amplio espectro de patógenos (Sticher y col., 1997; Nakashita, 2002; Nakashita y col., 2002a). En un estudio realizado en hojas de tomate, se observó que el BTH confería protección contra *P. syringae*. (Scarponi y col., 2001). El BTH es el primer compuesto sintético desarrollado y comercializado como inductor de la SAR con el nombre de BION en Europa y con el nombre de ACTIGARD en Estados Unidos. Vallad y Goodman (2004) resaltaron 32 ejemplos en los que proporcionaba protección frente a varias enfermedades. El BTH protege a la uva del ataque de *B. cinerea*, además de promover la síntesis de resveratrol y de antocianinas (Iriti y col., 2004). En tomate, el tratamiento con BTH protege a la planta frente a *B. cinerea*, pero no induce resistencia frente al biótrofo *O. neolycopersici* (Achuo y col., 2004). En cambio, en tabaco el BTH es efectivo induciendo resistencia frente a *O. neolycopersici* pero no contra *B. cinerea*. Este hecho apunta hacia una divergencia en las rutas de resistencia entre especies vegetales (Achuo y col., 2004).

Análogos del ácido jasmónico

El JA y los metil-jasmonatos (MeJA), denominados colectivamente jasmonatos, son una clase de oxilipinas derivadas de la oxidación de los ácidos grasos, vía lipooxigenasas. El tratamiento con JA o con MeJA, protege a las plantas de patata y de tomate de *P. infestans*, a través de un mecanismo en el que la sistemina no parece estar implicada (Cohen y col., 1993). A concentraciones bajas el JA no tiene efecto directo sobre el patógeno, pero a ciertas concentraciones el JA podría inhibir

la germinación y el crecimiento del micelio de *P. infestans* (Cohen y col., 1993). El JA también es capaz de inhibir la formación del apresorio en *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei* (Schweizer y col., 1993). El MeJA puede ser aplicado como tratamiento postcosecha en fresa contra *B. cinerea* (Moline y col., 1997). En cambio, el papel del JA en la defensa del tomate frente a *B. cinerea* aún no está bien establecido (Audenaert y col., 2002a; Díaz y col., 2002).

El etileno

El tratamiento con ET protege a las plantas de tomate contra *B. cinerea* (Díaz y col., 2002). Al inhibir la percepción de ET mediante el tratamiento con metilciclopropeno o con 2,5-norbornadieno, las plantas de tomate se vuelven más susceptibles a la infección por *B. cinerea*. Por otra parte, Elad (1993) había observado que la eliminación del ET en una atmósfera controlada hacía menos susceptibles a *B. cinerea* a varios cultivos incluyendo las plantas de tomate. En cambio, en zanahoria el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de ET hacía a las plantas más susceptibles a *B. cinerea*, lo que sugería que el ET estaba implicado en la resistencia a este patógeno. Uno de los problemas principales de utilizar el ET como inductor es que, en general, promueve la maduración del fruto y la senescencia de las hojas, lo que puede alterar la susceptibilidad de los tejidos (Panter & Jones, 2002). Muchas observaciones indican que cuando el ET es aplicado antes de inocular el patógeno, o no tiene efecto, o reduce el desarrollo de la enfermedad, mientras que si las plantas son tratadas después de la infección, ésta se acelera (Van Loon y col., 2006b).

Vitaminas

En particular la riboflavina y la tiamina se han descrito como inductores de la resistencia de las plantas. La tiamina induce SAR a través de la ruta dependiente de SA y de calcio. En cambio, la riboflavina, requiere los mecanismos de señalización mediada por quinasas y *NIM1/NPR1*, pero no la acumulación de SA (Dong & Beer, 2000; Ahn y col., 2007).

La vitamina soluble riboflavina muestra propiedades similares a los inductores sintéticos del SAR. Su aplicación foliar confiere resistencia en *Arabidopsis* a *Peronospora parasitica* y a *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* y en tabaco reduce la infección por TMV y *Alternaria alternata* (Dong & Beer, 2000). La inducción era más intensa cuando la riboflavina se aplicaba a 4 ó 5 días antes de la infección. La IR inducida por la riboflavina es dependiente de la señalización de las protein quinasas

y de *NPR1*. Sin embargo, las plantas transgénicas deficientes en la producción de SA (NahG), al ser tratadas con rivoftabina expresaban PRs, por lo que los autores concluyeron que la IR promovida por la rivoftabina es independiente de SA (Dong & Beer, 2000). Además, no producía muerte celular por lo que su mecanismo de acción también era independiente de la HR (Dong & Beer, 2000). Tanto la rivoftabina como su derivado roseoftabina protegen a las plantas de arroz frente a *P. infestans* (Aver'yanov y col., 2000).

El bisulfito sódico de la menadiona (MSB) es un derivado hidrosoluble de la vitamina K₃, para la que se había estudiado su efecto como regulador del crecimiento (Rama-Rao y col., 1985). Después se ha observado que su aplicación confiere resistencia en plantas de plátano a la enfermedad de Panamá, causada por *Fusarium oxisporum* (Borges y col., 2004). El MSB también protege a las plantas de colza frente al hongo *Leptosphaeria maculans*, estimulando la producción de ROS pero sin inducir *PR1* (Borges y col., 2003a). Los mismos autores han demostrado además que el MSB tiene un efecto de *priming* sobre la acumulación de fitoalexinas en las plantas de plátano frente a *Fusarium oxisporum* (Borges y col., 2003b) y lo consideran potencialmente útil en el control de la enfermedad de Panamá en los cultivos de plátano (Borges y col., 2004).

Sales de fosfato

Se ha visto que las sales de fosfato dibásicas y tribásicas inducen protección sistémica en pepino contra *Colletotrichum lagenarium* y contra un amplio espectro de enfermedades (Gottstein & Kuc, 1989; Mucharromah & Kuc, 1991; Reuveni y col., 2000). Esta protección está asociada con la muerte celular local precedida por una rápida producción de superóxidos y de peróxido de hidrógeno, además de la acumulación local y sistémica de SA (Orober y col., 2002). La aplicación del K₃PO₄ 25 mM sobre cebada en campo redujo la infección por *Blumeria graminis* en un 70%, comparado con los controles no tratados (Mitchell & Walters, 2004). La aplicación en las hojas primarias incrementaba la actividad PAL, peroxidasa y lipooxigenasa en las hojas secundarias y estas actividades se incrementaban más aún tras la inoculación con el patógeno (Mitchell & Walters, 2004). El tratamiento por spray de arrozales con K₂HPO₄ 50 mM por spray redujo el necrosamiento de la panícula producida por el hongo *Pyricularia oryzae* entre un 29% y un 41% (Manandhar y col., 1998).

Probenazol

El compuesto sintético probenazol se ha utilizado en el control de la piriculariosis causado por *Magnaporthe grisea* en Asia desde 1970 (Watanabe, 1977). Su componente activo, el *oryzmate* (1,2-benzoisotiazol-1,1-dioxido) también protege al arroz de otros patógenos, como como la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Iwata, 2001). Estudios posteriores han confirmado que el probenazol induce el SAR estimulando la acumulación de SA (Nakashita y col., 2002b).

El ácido β -aminobutírico (BABA)

El BABA es un aminoácido no proteico que constituye un potente inductor de la resistencia adquirida (Jakab y col., 2001). Se encuentra raramente en la naturaleza y curiosamente, sólo se ha detectado en exudados de la raíz de plantas de tomate crecidas en suelos solarizados (Gamliel & Katan, 1992). En Arabidopsis induce resistencia contra diversos patógenos, tanto biótrosos como necrótrofos (Jakab y col., 2001) y lo hace por medio de mecanismos, en parte, diferentes a los del SAR o del ISR (Zimmerli y col., 2001, Ton y col., 2005, van Hulten y col., 2006). Frente a *P. syringae* y *B. cinerea* requiere la acumulación de SA y *NPR1/NIM1/SAI1*, similarmente al SAR (Zimmerli y col., 2001). Sin embargo, la acumulación de SA y *NPR1* no son necesarios para la IR frente al hongo necrótrofo *P. cucumerina* (Ton & Mauch-Mani, 2004) ni frente al oomiceto *H. parasitica* (Zimerli y col., 2000). Por otra parte, se han encontrado mutantes deficientes en la producción o en la sensibilidad al ácido abscísico (ABA) que son incapaces de generar la resistencia inducida por BABA (Ton & Mauch-Mani, 2004). Además de inducir la respuesta dependiente de SA, el BABA también induce una mayor y más rápida acumulación de calosa frente a hongos y oomicetos. Se ha encontrado un mutante deficiente en calosa, *pnr4-1*, que no muestra el fenotipo de resistencia inducida por el BABA (Ton & Mauch-Mani, 2004) sugiriendo que el aumento en la deposición de calosa es importante en la resistencia inducida por BABA contra hongos necrótrofos. Por tanto, la inducción mediada por BABA implica tanto mecanismos de defensa dependientes de SA, como mecanismos dependientes de ABA y de la acumulación de calosa, variando la importancia de un tipo de mecanismo u otro según la naturaleza del patógeno (Ton y col., 2005). El BABA también induce resistencia a estreses abióticos y es eficaz en numeros sistemas planta-patógeno, incluido tomate-*B. cinerea* (Cohen, 2002). El BABA es capaz de conferir protección a las plantas sin efectos colaterales sobre el crecimiento, porque el BABA no activa

directamente el arsenal defensivo de la planta, sino que hace que la planta produzca una respuesta más rápida y más intensa cuando se produce el ataque del patógeno o se inicia el estrés abiótico (Zimerli y col., 2000; Jakab y col., 2001; Ton & Mauch-Mani, 2004), lo que se conoce como el fenómeno de *priming*.

El concepto de Priming

Tras cualquier tratamiento inductor, normalmente se necesita un periodo de tiempo para que se expresen los mecanismos de resistencia, tanto a nivel local como a nivel sistémico. La resistencia inducida puede expresarse principalmente de tres maneras distintas: (1) Los mecanismos de defensa son estimulados por el inductor y no cambian tras la inoculación del patógeno. (2) Las defensas son estimuladas por el agente inductor, pero se incrementan tras la inoculación del patógeno. (3) Los mecanismos de defensa no se expresan hasta que la planta es inoculada con el patógeno. De este último modo de acción, característico de unos pocos inductores, es al que se refiere el concepto de *priming* (Conrath y col., 2002), traducido como sensibilización, potenciación o cebado. Se denomina así por analogía con un fenómeno similar que se da en animales y humanos (Hayes y col., 1991; Wyatt y col., 1996),

Los mecanismos fisiológicos y moleculares por los que se produce el fenómeno de *priming* son desconocidos. La primera investigación sistemática se llevó a cabo usando cultivos celulares de *Petroselinum crispum* (perejil). Los autores demostraron que el pretratamiento de las células con SA o con sus análogos, hacía que produjesen mayores cantidades de la fitoalexina cumarina en respuesta a los elicitores *pmg* de *Phytophthora megasperma* sp. *glycinea* (Kauss y col., 1992). Posteriormente Mur y colaboradores (1996) propusieron un doble papel del SA como inductor de la SAR: un efecto directo a concentraciones más altas, induciendo la expresión de PRs propias de la respuesta basal y un efecto indirecto a dosis bajas, regulando una mayor expresión de genes relacionados, como el de la PAL, tras la elicitación de la respuesta defensiva.

En *Arabidopsis*, la inducción biológica del SAR por una cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000* no sólo está asociada a una inducción directa de los genes *PR*, sino que potencia la activación de *PAL*, *PR1*, *PR2* y *PR5* en los tejidos sistémicos, sólomente tras la inoculación con el patógeno (Cameron y col., 1999; Kohler y col., 2002; Van Wees y col., 1999). En tomate, las micorrizas protegen a la planta contra *Phytophthora parasitica*, mostrando una mayor acumulación de *PR1* en respuesta al patógeno (Pozo y col., 1999 y 2002).

En general, la IR producida por microorganismos beneficiosos no está asociada con cambios en la expresión de los genes de defensa (Pieterse y col., 2002), probablemente porque ello supondría un gran gasto de los recursos de la planta (Van Hulten y col., 2006). Por esto el *priming* resulta un modo de IR muy beneficioso (Van Hulten y col., 2006). Desde el punto de vista económico, el *priming* es la solución al dilema entre la protección de las plantas a enfermedades y el coste que implica la activación de las defensas (Bostock, 2005; Conrath y col., 2006). Otra ventaja viene dada por el descubrimiento de que numerosas proteínas PR muestran propiedades alergénicas (Hoffmann-Sommergruber, 2001). Si su acumulación se incrementara de manera permanente, en lugar de reservar su inducción hasta el momento de la interacción con el patógeno, ello podría implicar costes adicionales de inaceptabilidad (Gozzo, 2003).

Compuestos que presentan efecto inductor y fungicida

Algunos compuestos que funcionan como inductores pueden tener también un efecto antimicrobiano directo, bajo determinadas condiciones. Entre ellos se encuentran el quitosano, algunos compuestos presentes en aceites esenciales de las plantas y algunos de los compuestos volátiles emitidos por las plantas.

El quitosano

El quitosano, un polímero de β -1,4-D-glucosamina, parece actuar jugando una función dual, siendo su efecto dependiente de la concentración. Por una parte activa las respuestas de las plantas y por otro lado, inhibe el crecimiento de los hongos (Elgaouth y col., 1992 a y b).

Se ha utilizado como alternativa contra la podredumbre azul en manzanas y se ha visto que en vez de inhibir directamente a *P. expansum*, el quitosano actúa principalmente induciendo resistencia en el fruto (de Capdeville y col., 2002). También resulta eficaz en cultivos celulares de uva (Repka, 2001).

En plantas de tomate el tratamiento por spray con quitosano reduce la infección por *B. cinerea* cuando se aplica 1 hora antes de la inoculación, pero no se observa efecto alguno cuando se aplica 24 horas después (Ben-Salom y col., 2003).

Componentes lipofílicos de los aceites esenciales

En general, la actividad antifúngica de los aceites esenciales está bien documentada (Meepagala y col., 2002). El timol es un aceite esencial del tomillo cabezudo (*Thymus capitatus*) y se ha utilizado con fines medicinales, como conservante y como aditivo alimentario. Se ha demostrado la eficacia de los aceites esenciales de *Thymus capitatus* contra *B. cinerea* (Arras & Usai, 2001). Se cree que podrían actuar también sobre los mecanismos de defensa de las plantas (Mihaliak y col., 1991), aunque sólo se ha estudiado la eficacia *in vivo* de unos pocos. La fumigación de cerezas con timol es efectiva en el control de *B. cinerea* (Chu y col., 1999). Es interesante el hecho de que la *Food and Drug Administration* (USA) tiene registrado el timol como alimento para el consumo humano y como aditivo alimentario, cuando fue introducido en USA como pesticida en 1964 (Tripathi y col., 2004). El aceite de tomillo también está incluido en la lista comunitaria de sustancias activas que no se consideran como productos fitosanitarios (Reglamento CE 647/2007). Posteriormente, se ha estudiado el efecto antifúngico de los aceites esenciales de varias plantas de la familia Labiatae contra *B. cinerea* (Bouchra y col., 2003) siendo los de *Origanum compactum* y *Thymus glandulosus* los más efectivos contra *B. cinerea*. Su efecto era debido principalmente al timol y al carvacrol. Se ha sugerido que el carvacrol interacciona con la membrana plasmática del patógeno (Thompson, 1996).

Se ha observado que la carvona, un monoterpeno aislado del aceite esencial de *Carum carvi*, tiene actividad como regulador del desarrollo inhibiendo la aparición de brotes en las patatas durante el almacenamiento, además de exhibir actividad fungicida sin toxicidad para los mamíferos (Hartmans y col., 1995; Oosterhaven y col., 1995a, b y c). La carvona ha sido introducido en Holanda con el nombre de TALENT. También se ha visto que el aceite esencial de *Salvia officinalis* alarga la vida media de almacenamiento de algunas hortalizas y las protege de ataques por hongos (Bang, 1995).

Compuestos volátiles emitidos por las plantas (VOCs)

Todas las plantas pueden emitir cantidades substanciales de VOCs incluyendo alcanos, alquenos, alcoholes, aldehídos, éteres, ésteres y ácidos carboxílicos (Peñuelas & Llusià, 2004). Los monoterpenos son una clase de isoprenoides de 10 átomos de carbono que comprende alrededor de 1000 compuestos volátiles lipofílicos incoloros. Son los constituyentes más conocidos de los aceites esenciales y las esencias florales de las plantas aromáticas (Mahmoud & Croteau, 2002) y

están implicados en las defensas de las plantas (Pichersky & Gershenzon, 2002). Las enzimas clave implicadas en su síntesis se inducen en hojas tras el ataque por herbívoros (Arimura y col., 2004). Los VOCs emitidos por las plantas estresadas contienen volátiles de fronda verde *green leafy volatiles* (GLVs), terpenoides, metil-jasmonato (MeJA), metil-salicilato (MeSA), metanol, ET y otras sustancias (Paré, 1997). Los terpenoides y los derivados de los ácidos grasos son las clases predominantes (Pichersky & Gershenzon, 2002). Por una parte, muchos de esos compuestos tienen un efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio de los hongos patógenos como *Alternaria alternata* y *B. cinerea* (Hamiltonkemp y col., 1992; He y col., 2006). Por otra parte, el fenómeno de la resistencia inducida ha sido asociado recientemente a señales transmitidas por compuestos volátiles producidos por las plantas, que pueden generar resistencia en las plantas vecinas a una planta atacada por un herbívoro. Por ejemplo, *Gerbera jamesonii* o la lima *Phaseolus lunatus* emite el monoterpeno (E)- β -ocimeno-2 o limoneno cuando la planta es atacada por el ácaro *Tetranychus urticae* (Ozawa y col., 2000; Krips y col., 2001). El contenido en (E)- β -ocimeno-2 aumenta rápidamente tras el daño mecánico o el ataque herbívoro en *Arabidopsis* (Fäldt y col., 2003). Se cree que estos volátiles emitidos actúan atrayendo a los predadores naturales de los ácaros (Choh y col., 2004; Kost & Heil, 2005; Ruther & Kleier, 2005). Por otra parte, la exposición a VOCs de hojas dañadas de artemisa potencia la inducción de los inhibidores de proteinasa en tabaco y como resultado de ello las plantas expuestas reciben menos daño (Kessler y col., 2006). Además, la exposición a VOCs por sí sola, sin un ataque herbívoro, puede aumentar directamente la producción de respuestas defensivas o, alternativamente, hacer que las plantas vecinas preparen sus defensas (Baldwin y col., 2006). Los herbívoros transmiten patógenos frecuentemente y puede que la inducción de las defensas durante el ataque tenga lugar con el objetivo de impedir subsiguientes ataques por patógenos, más que impedir el ataque del propio herbívoro (Jiménez-Martínez y col., 2004). La adición exógena de (E)- β -ocimeno-2 induce genes relacionados con la patogénesis (genes *PR*) y la actividad PAL en *Phaseolus lunatus* (Arimura y col., 2001). Otros autores observaron que el tratamiento con un isómero estructural del (E)- β -ocimeno-2, el alo-ocimeno-1, aumentó la resistencia a *B. cinerea* en *Arabidopsis*, además de inducir un subconjunto de genes relacionados con la defensa, incluyendo el gen de la lipooxigenasa 2 (*Lox2*). Este aumento de la resistencia a *B. cinerea* y la inducción de los genes era, en parte, dependiente de las rutas de señalización de JA y ET (Kishimoto y col., 2005). Los volátiles de fronda verde o *green leafy volatiles* (GLV) como el (E)-3-hexen-1-ol y el (E)-2-hexen-ol, son en su mayoría moléculas de seis átomos de carbono con grupos aldehído,

alcohol y éster. Los GLV también son comúnmente emitidos por las plantas en respuesta al daño mecánico producido por herbívoros. Estos volátiles inducen una rápida producción de JA en las plantas tras el ataque de *Spodoptera exigua* (Engelberth y col., 2004). Se ha postulado que los aldehídos de 6 átomos de carbono podrían activar las respuestas defensivas de *Arabidopsis* gracias a su reactividad electrofílica (Alméras y col., 2003). Los compuestos (Z)-3-hexenal, (Z)-3-hexen-1-ol y (Z)-3-hexenil pueden potenciar a las plantas de *Arabidopsis* para que respondan al ataque por patógenos con una producción de JA más rápida y más intensa (Baldwin, 2006), es decir, que tienen un efecto de *priming*. El tratamiento de *Arabidopsis thaliana* con (Z)-3-hexenal-4 o (E)-hexenal-3 aumentó la resistencia frente a *B. cinerea* (Kishimoto y col., 2005). Las plantas de tomate producen muchos compuestos de cinco y seis átomos de carbono derivados de la ruta de las lipooxigenasas tales como el 1-penten-3-ona, 1-penten-3-ol, 5-pentanal, (Z)-3-hexenal, hexanal, (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenol y hexanol (Buttery & Ling, 1993). Por ejemplo, el (E)-2-hexenal es producido y acumulado vía lipooxigenasa o por oxidación de residuos acilo de ácidos grasos de la fosfatidilcolina y otros fosfolípidos tras un daño mecánico de la planta, infección por un patógeno y otros estreses, jugando un importante papel en la defensa frente a patógenos microbianos (Grechkin, 1998). El (E)-2-hexenal inhibe el crecimiento de *Pseudomonas syringae* (Croft y col., 1993). Estudios recientes han demostrado la capacidad inhibitoria del (E)-2-hexenal en los procesos de germinación y crecimiento de *B. cinerea* (He y col., 2006). Además, se ha visto que podría funcionar como un elicitador volátil de la respuesta defensiva en plantas de algodón (Zeringue, 1992) y posteriormente se ha demostrado que el (E)-2-hexenal aumenta la resistencia frente a *B. cinerea* en *Arabidopsis*, induciendo la lignificación de las células epidermales y la acumulación de camalexina (Kishimoto y col., 2006). Todas estas observaciones muestran que algunos volátiles emitidos por las plantas podrían tener una doble funcionalidad como fungicida directo sobre el patógeno y como inductor de las respuestas defensivas de las plantas.

Antecedentes y objetivos particulares

Durante los últimos años el grupo de investigación al que me incorporé para la realización de la presente tesis doctoral ha focalizado su interés en la búsqueda y desarrollo de compuestos que incrementen la protección frente a patógenos y que sean seguros para los consumidores y para el medio ambiente. Entre ellos se ha demostrado la eficacia de diversos derivados del ácido adípico, un ácido dicarboxílico que se utiliza como aditivo alimentario y como conservante (Hanssen, 1987). Se demostró que el monoéster etílico del ácido adípico (AAME) (Flors y col., 2001), así como el tratamiento con un glucósido derivado de éste, el 1,2,3,4-tetra-O-acetil-6-etiladipato- β -D-glucopiranososa (Flors y col, 2003a) y con tres amidas del mismo (Flors y col., 2003 b) produjeron efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas, resultando más resistentes a distintos tipos de estreses. También se demostró que algunos de los compuestos analizados mostraban actividad antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de los hongos (Flors et al, 2004). Entre ellos el AAME resultó efectivo *in vitro* frente a diversos hongos, entre los que se encontraban *Alternaria alternata*, *Phytophthora* sp y *Botrytis cinerea*.

A partir de los resultados obtenidos se inició el estudio de ácidos carboxílicos de origen natural que pudiesen actuar como inductores de las defensas naturales de las plantas.

Los objetivos concretos del estudio que se describe en este capítulo consistieron, por una parte, en caracterizar el efecto fungicida del AAME sobre *B. cinerea* y, por otra parte, estudiar el efecto protector del ácido hexanoico en tomate frente a *B. cinerea*, caracterizando su acción sobre los mecanismos de respuesta de las plantas.

RESULTADOS

Caracterización de la acción fungicida del monoéster etílico del ácido adípico (AAME)

Estudio del efecto sobre la germinación de esporas de Botrytis cinerea. Influencia del pH.

Se analizó el efecto de la concentración del AAME a diferentes pHs del medio, sobre la germinación *in vitro* de las esporas de *B. cinerea*. Para ello se incubaron las esporas con concentraciones crecientes de AAME, en medio PDB ajustado a tres pHs distintos para cada concentración ensayada. Los PHs escogidos fueron: un pH similar al pKa del AAME (pKa= 4,69) y un pH una unidad por encima y por debajo de dicho pKa. Tras 24h de incubación, se determinó mediante observación microscópica el porcentaje de esporas germinadas en cada caso, con respecto a un control constituido por esporas incubadas en medio PDB. Se estableció como criterio de germinación que las esporas hubieran desarrollado un tubo germinativo de, al menos, igual longitud que el tamaño de la espора.

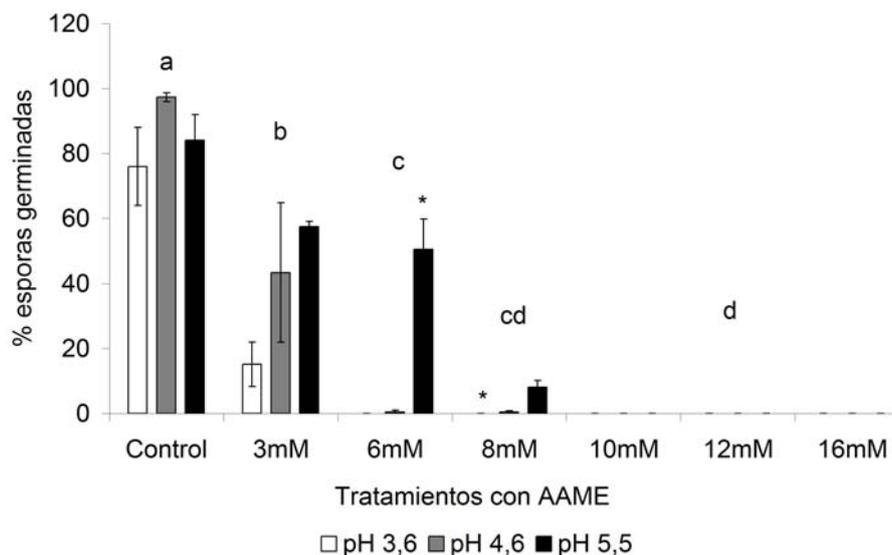


Figura 18. Efecto del AAME sobre la germinación de esporas de *B. cinerea*. Dependencia de la concentración y del pH del medio. El porcentaje de germinación se determinó por observación microscópica de esporas de *B. cinerea*, tras 24 h de incubación en PDB o con diferentes concentraciones de AAME en medio PDB, ajustado a tres pHs distintos. Las barras muestran la media de los porcentajes de germinación de cuatro experimentos independientes \pm el error estándar, para cada tratamiento. Los grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) respecto de los tratamientos, están indicados con letras. Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias, dentro de un mismo tratamiento, con respecto al pH del medio, están indicadas mediante un asterisco (*).

Los resultados obtenidos mostraron que la variación del pH del medio influye en la actividad antifúngica del AAME, mostrando mayor eficacia a un pH por debajo del pKa (figura 18). Se comprobó que, en el rango ensayado, el pH no afectó significativamente a la germinación de las esporas de *B. cinerea* en medio PDB. Se definió la mínima concentración inhibitoria (MCI) como la concentración más baja del compuesto en presencia de la cual no se observaban esporas germinadas, tras 24 h de incubación (que es el tiempo de germinación estimado para las esporas de *B. cinerea*) a pH 5,5. Se consideró como mínima concentración fungicida (MCF) la concentración más baja del compuesto para la que, tras su eliminación, no se producía germinación tras 24 h de incubación (ver Materiales y Métodos). Se estimó que la MCI para el AAME era 10 mM, mientras que la MCF fué de 16 mM, a todos los pHs analizados.

El análisis microscópico de las muestras confirmó la dependencia del pH del medio en la eficacia antifúngica del AAME, a concentraciones menores que la CMI (figura 19), observándose un mayor retraso en la germinación a los pHs inferiores.

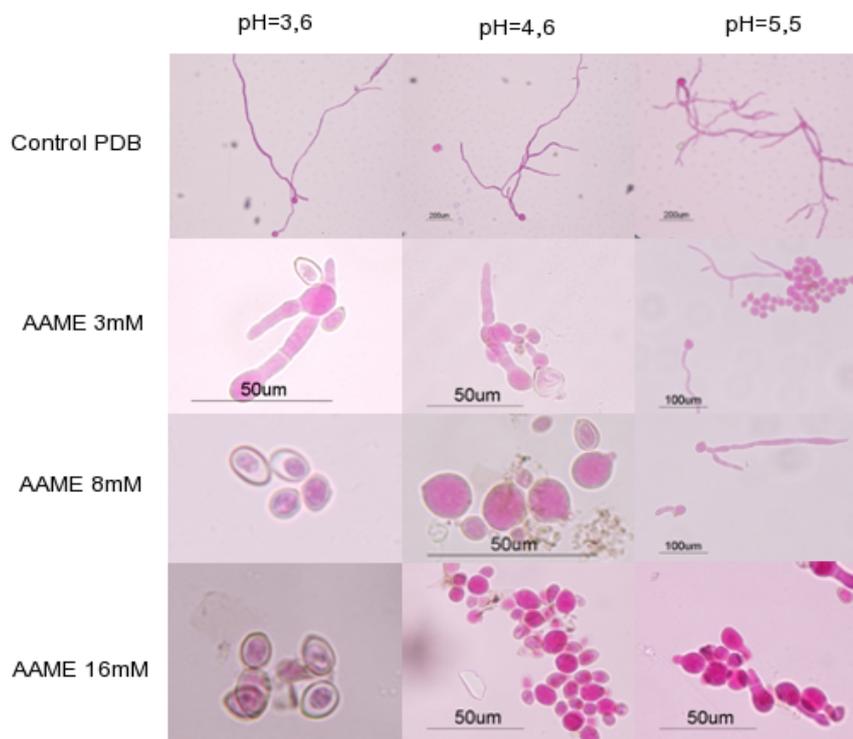


Figura 19. Análisis microscópico de la germinación de esporas de *B. cinerea* en presencia de AAME. Dependencia de la concentración y del pH del medio. Esporas de *B. cinerea* fueron incubadas durante 24 h en medio PDB (control) o con diferentes concentraciones de AAME en medio PDB, a tres pHs distintos. Posteriormente se tiñeron con lactofucsina para su observación microscópica.

Sólo se observó la completa inhibición de la germinación, sin que se produjera desarrollo del tubo germinativo, en los tratamientos con AAME a la MCF (16mM) a todos los pHs ensayados. En estas condiciones se observó también la retracción del citoplasma de la espora.

Se comprobó que a concentraciones inferiores a la MCF sólo se producía un retraso en la germinación de las esporas, observándose el desarrollo del micelio tras 7 días de incubación (Figura 20). Se confirmó, asimismo, la dependencia del pH a estas concentraciones de AAME. Estos resultados confirmaron lo observado previamente en el análisis microscópico, en el que a concentraciones no fungicidas se producía el hinchamiento de las esporas y un incipiente desarrollo del tubo germinativo (figura 19).

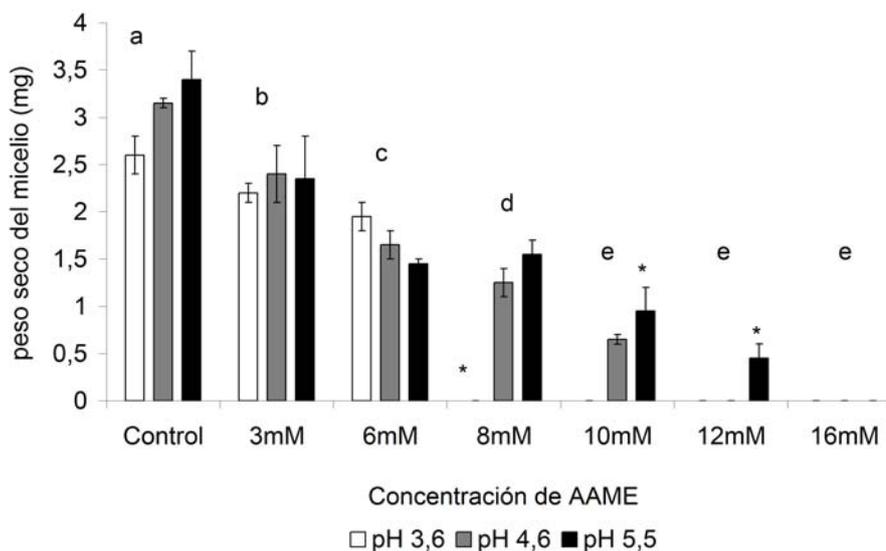


Figura 20. Desarrollo del micelio a partir de esporas de *Botrytis cinerea* tratadas con diferentes concentraciones de AAME. Esporas de *B. cinerea* fueron incubadas en medio PDB o con diferentes concentraciones de AAME en medio PDB, a diferentes pHs durante 7 días. El micelio obtenido se filtró y secó hasta obtener un peso constante. Las barras muestran la media del peso seco obtenido en cuatro experimentos independientes \pm el error estándar para cada tratamiento. Los grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) respecto de los tratamientos, están indicados con letras. Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias dentro de un mismo tratamiento con respecto al pH, están indicadas mediante un asterisco (*).

Estudio del efecto del AAME sobre el crecimiento del micelio

Se estudió el efecto del tratamiento con distintas concentraciones de AAME, sobre el crecimiento de las hifas a partir de esporas previamente germinadas. Para ello se germinaron esporas de *B. cinerea* en PDB, y se incubaron con distintas concentraciones de AAME durante 5 días, ajustando el pH del medio a 5,5. Se

escogió el pH más elevado para poder estudiar el efecto del tratamiento en las condiciones más restrictivas, ya que se había demostrado que el pH influye en su actividad fungicida.

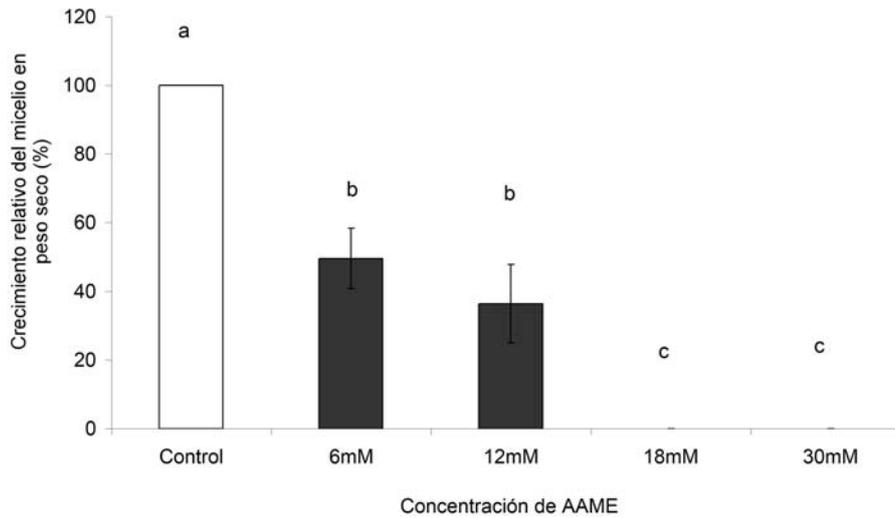


Figura 21. Efecto del AAME sobre el crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea*. Esporas de *B. cinerea* se incubaron durante 24 h en medio PDB y una vez confirmada la germinación de las mismas, se incubaron con diferentes concentraciones de AAME en medio PDB, a pH a 5,5. Esporas incubadas en PDB fueron utilizadas como control. Se analizó el micelio obtenido tras 5 días de incubación, mediante filtrado y secado hasta obtener un peso constante. Las barras muestran la media del porcentaje del peso seco respecto del control, de tres experimentos independientes \pm el error estándar para cada tratamiento. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) respecto de los tratamientos, están indicadas con letras.

Los resultados obtenidos demuestran que el AAME inhibe también el desarrollo del micelio, de una forma dependiente de la concentración (Figura 21). Se comprobó que a concentraciones inferiores a la MCF se produce una considerable reducción en el desarrollo del micelio, cercana al 50 % así como una inhibición completa a concentraciones superiores. Por lo tanto, el AAME inhibe tanto la germinación de las esporas de *B. cinerea* como el desarrollo del micelio.

Efecto sobre la integridad de las membranas de B. cinerea

Se estudió el posible mecanismo de acción del AAME, analizando el efecto producido por los tratamientos sobre las membranas del hongo. Para ello, se trataron esporas previamente germinadas con AAME a una concentración fungicida, utilizando el tratamiento con liticasa como control, ya que es una enzima que

provoca la lisis de la membrana celular de varias levaduras y hongos, incluyendo *B. cinerea* (Jewell y col., 2002). Después de los distintos tratamientos, las esporas se tiñeron y se observaron al microscopio.

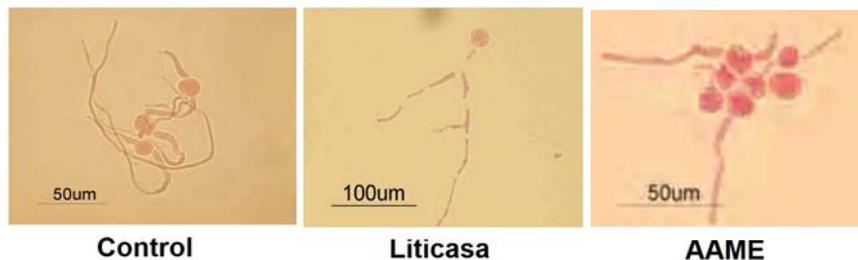


Figura 22. Efecto del AAME sobre la integridad de las membranas de *B. cinerea*. Esporas de *B. cinerea* previamente germinadas, fueron incubadas en medio BSG (Control), en presencia de liticasa (Liticasa), o en presencia de AAME 30 mM (AAME). Tras 2 h de incubación, cada muestra fue teñida con lactofucsina y se procedió a su observación mediante microscopía óptica.

Se comprobó que el tratamiento con AAME, a una concentración fungicida, no producía la fragmentación de la membrana de *B. cinerea*, que sí se observaba en las esporas tratadas con liticasa, en las que las hifas aparecían septadas (figura 22).

Efecto sobre la permeabilidad de las membranas del hongo

Se determinó si el tratamiento con AAME alteraba la permeabilidad de las membranas. Para ello se trataron esporas germinadas de *B. cinerea* con una concentración fungicida de AAME, utilizando como control una saponina. Las saponinas interaccionan con los esteroides de la membrana celular, aumentando la permeabilidad de la misma, lo que se puede demostrar analizando la concentración de iones fosfato que fluyen hacia el medio extracelular (Mendoza y col., 1997).

Así, tras los distintos tratamientos se determinó el contenido en fosfato del medio extracelular. Se comprobó que el tratamiento con AAME incrementó la salida de iones fosfato al medio (figura 23a), sugiriendo que se había alterado la permeabilidad de la membrana, lo que podría constituir uno de los mecanismos por los que el AAME inhibe el crecimiento de *B. cinerea*.

Para confirmar este efecto sobre la permeabilidad de la membrana, las esporas tratadas se tiñeron con eosina básica, un colorante vital que penetra en la célula sólo si la permeabilidad de la membrana está alterada (de Victoria & Galván, 2003; Ducci *et al.*, 2002). Se comprobó que las esporas tratadas tanto con saponina, como con AAME, se teñían con la eosina, mientras que las esporas no tratadas

permanecían sin teñir (figura 23b). Estos resultados confirmaron la alteración de la permeabilidad de la membrana de *B. cinerea*, provocada por el AAME.

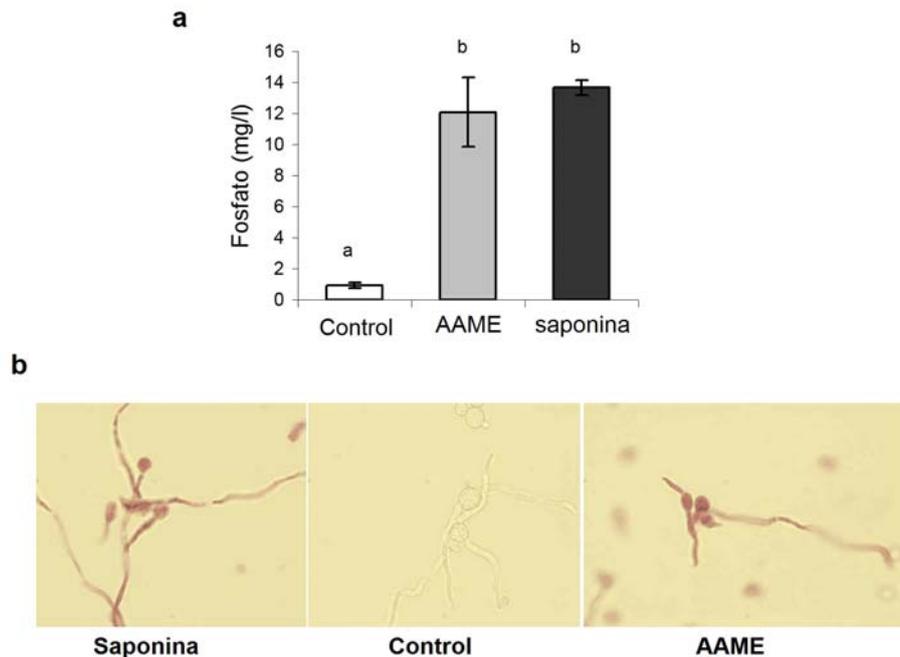


Figura 23. Efecto del AAME sobre la permeabilidad de las membranas de *B. cinerea*. (Figura 23a) Micelio de *B. cinerea* crecido en PDB durante tres días se incubó en tampón Tris (control), en presencia de AAME 20 mM (AAME) o en presencia de saponina (Saponina) durante 6 h. Se midió la concentración de fosfato en el medio de incubación mediante cromatografía de intercambio iónico. Las barras muestran la media de los valores obtenidos en 4 réplicas \pm el error estándar para cada tratamiento. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) respecto de los tratamientos, están indicadas con letras. (Figura 23b) Las esporas germinadas fueron incubadas en los medios mencionados en la Figura 23a durante 6 h y cada muestra fue teñida con eosina básica, para su observación mediante microscopía óptica.

Inoculación de frutos de tomate con esporas tratadas con AAME

Se procedió a determinar si la eficacia fungicida del AAME, demostrada *in vitro*, se mantenía sobre un soporte biológico. Para ello se inocularon frutos de tomate con esporas de *B. cinerea*, previamente tratadas con una concentración fungicida de AAME. Se utilizaron esporas no tratadas como control de infección y la inoculación con agua estéril, como control no inoculado (Figura 24, Control agua). El avance de la infección se monitorizó determinando los síntomas de necrosis en la zona de inoculación (figura 24). En nuestro sistema experimental la necrosis aparece 48 h después de la inoculación y tras 96 h la necrosis es superior a 1 cm de diámetro, observándose ya el crecimiento del micelio de *B. cinerea* (Figura 24, Control infectado). Sin embargo, tras las 96 h.p.i. no se observaron síntomas de infección

en aquellos frutos inoculados con esporas tratadas previamente con AAME 16 mM (Figura 24, AAME). Este efecto se mantuvo incluso después de haber eliminado el tratamiento mediante lavado de las esporas, antes de proceder a la inoculación de las mismas (Figura 24, AAME lavado).

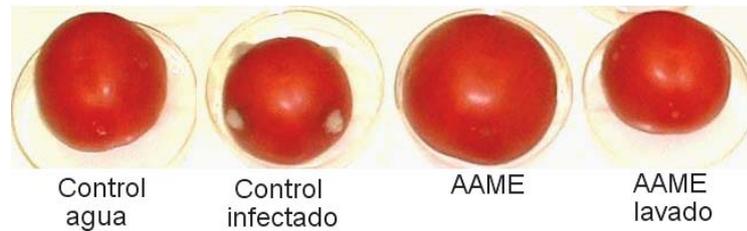


Figura 24. Inoculación en frutos de tomate de esporas de *B. cinerea* tratadas con AAME. Frutos de tomate cv Ailsa Craig en estado maduro se inocularon con agua (control agua), con esporas incubadas durante 2 h en agua (control infectado), con esporas tratadas con AAME 16 mM (AAME) o con esporas incubadas en AAME 16 mM y lavadas para eliminar el tratamiento (AAME lavado). Los frutos inoculados se incubaron durante 96 h y se analizaron los síntomas de infección. En la foto se muestra el resultado de un experimento representativo, en el que se utilizaron 8 frutos por tratamiento.

Estos resultados demuestran que el tratamiento de las esporas de *B. cinerea* con AAME mantiene su efecto fungicida, tras su inoculación en frutos de tomate. Este efecto inhibitorio es irreversible en un contexto biológico, ya que las esporas no germinan en el fruto, tras eliminar el tratamiento.

Estudio de la capacidad protectora del ácido hexanoico frente a *Botrytis cinerea* en plantas de tomate

Tratamiento de plantas de tomate con ácido hexanoico

Para testar el efecto del ácido hexanoico en la infección producida por *B. cinerea*, se trataron por vía radicular plantas de tomate cv. Ailsa Craig con diferentes concentraciones de ácido hexanoico, en condiciones hidropónicas. El rango de concentraciones utilizado y la duración del tratamiento se establecieron teniendo en cuenta las condiciones utilizadas con otros inductores conocidos, como el BABA y los análogos del SA (Cohen y col., 1994; Zimerli, 2001; Iriti y col., 2004; Borges y col., 2003a y b). Tras 48h de tratamiento, las plantas fueron inoculadas con esporas de *B. cinerea*. A las 72 h.p.i. se midió el área de la necrosis en las hojas inoculadas. Se comprobó que el tratamiento con ácido hexanoico reducía significativamente las lesiones producidas por *B. cinerea*, de una forma dependiente de la concentración (Figura 25). El tratamiento resultó eficaz incluso a 0.06 mM, una concentración incluso inferior a las utilizadas habitualmente con otros inductores (Cohen y col., 2002; Zimerli, 2001; Thaler y col., 2004), lo que apoyaba la idea de que el ácido hexanoico pudiera actuar como inductor de los mecanismos de defensa naturales de las plantas.

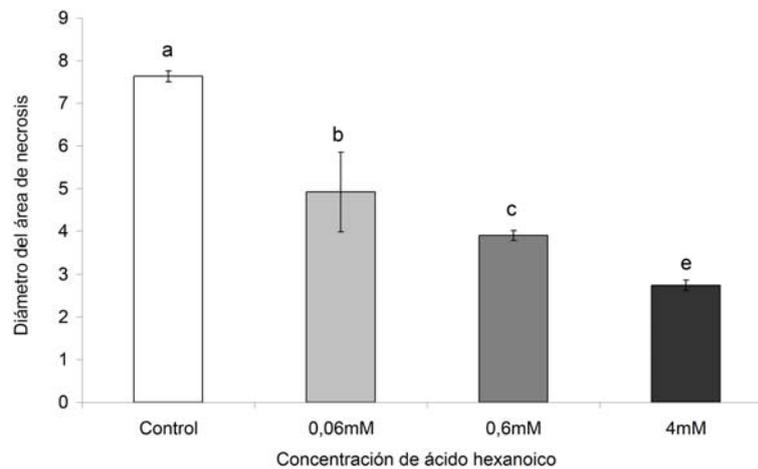


Figura 25. Estudio de la infección con *Botrytis cinerea* en plantas de tomate previamente tratadas con ácido hexanoico. Plantas de tomate (cv. Ailsa Craig) de 4 semanas de desarrollo se trataron 48 h, por vía radicular, con distintas concentraciones de ácido hexanoico. Posteriormente se inocularon con *B. cinerea* y 72 h.p.i. se midió el diámetro de la necrosis en los puntos de inoculación. Las barras muestran la media del diámetro de las necrosis en un experimento representativo (n=10) \pm el error estándar, para cada tratamiento. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) están indicadas con letras.

Para confirmar esta hipótesis se determinó si las concentraciones a las que el ácido hexanoico protegía frente al hongo, presentaban actividad antifúngica. Para ello se analizó la germinación *in vitro* de las esporas de *B. cinerea* en presencia de concentraciones crecientes de ácido hexanoico y se comparó con respecto a la de esporas no tratadas mediante observación microscópica, tal como se describe en el primer apartado del presente capítulo. Se comprobó que el ácido hexanoico a 0,6 mM no afectaba a la germinación *in vitro* de las esporas de *B. cinerea*, por lo que el efecto protector observado previamente en plantas de tomate, podía deberse a un efecto inductor de las defensas naturales de *Solanum lycopersicum* (Figura 26).

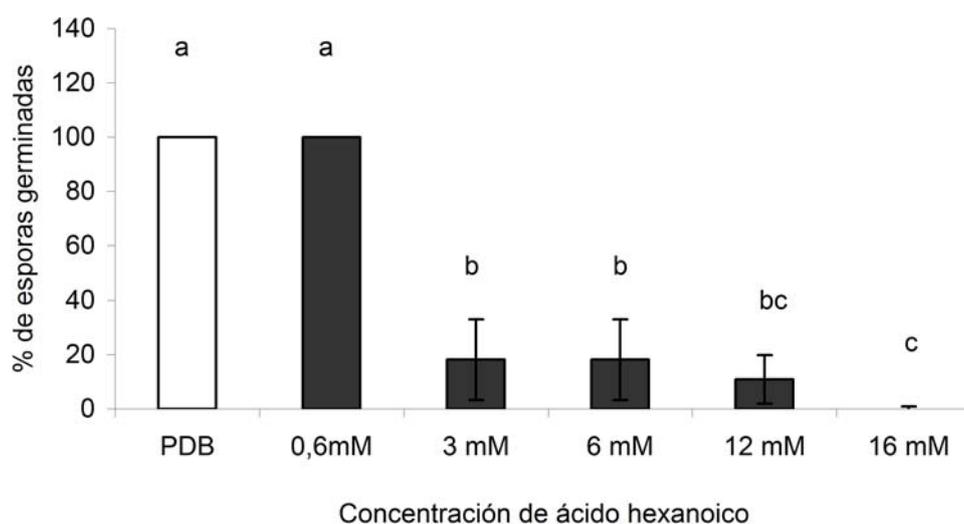


Figura 26. Efecto del ácido hexanoico sobre la germinación *in vitro* de esporas de *Botrytis cinerea*. Se determinó, mediante análisis microscópico, el porcentaje de germinación de esporas de *B. cinerea* tratadas durante 24 h en medio PDB o con diferentes concentraciones de ácido hexanoico en PDB. Las barras muestran la media de los porcentajes de germinación de cuatro experimentos independientes \pm el error estándar para cada tratamiento. Los grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) están indicados con letras.

Se observó, sin embargo, que a concentraciones superiores a 0,6 mM el ácido hexanoico reducía significativamente el porcentaje de esporas germinadas mostrando, por tanto, un efecto antimicrobiano. Se determinó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) era 16 mM. Los resultados obtenidos indicaron que el ácido hexanoico podría proteger a las plantas de tomate frente a *B. cinerea* ejerciendo un doble efecto: como inductor de las defensas de las plantas, a concentraciones inferiores a 3 mM y como fungicida, a concentraciones superiores.

Caracterización del efecto inductor del ácido hexanoico.

Comparación de la eficacia protectora del ácido hexanoico con la de otros inductores

Se comparó el efecto ejercido por el ácido hexanoico (0,6 mM) sobre plantas de tomate cv. Ailsa Craig de 4 semanas de desarrollo, con el de otros compuestos inductores de las defensas de las plantas, tales como el ácido salicílico (SA) y el ácido β -aminobutírico (BABA). El SA fue escogido porque se había demostrado previamente su eficacia frente a *B. cinerea* en plantas de tomate (Díaz y col., 2002). El BABA fue utilizado porque se había comprobado su eficacia como inductor de defensas frente a *B. cinerea*, tanto en tomate (Cohen y col., 2002), como en *Arabidopsis* (Zimmerli y col., 2001).

Como puede observarse en la Figura 27, el nivel de protección ejercido por el ácido hexanoico fue notablemente superior al del SA y similar al del BABA, llegando a reducir el diámetro de la necrosis producida por la infección hasta en un 50% (Figura 27).

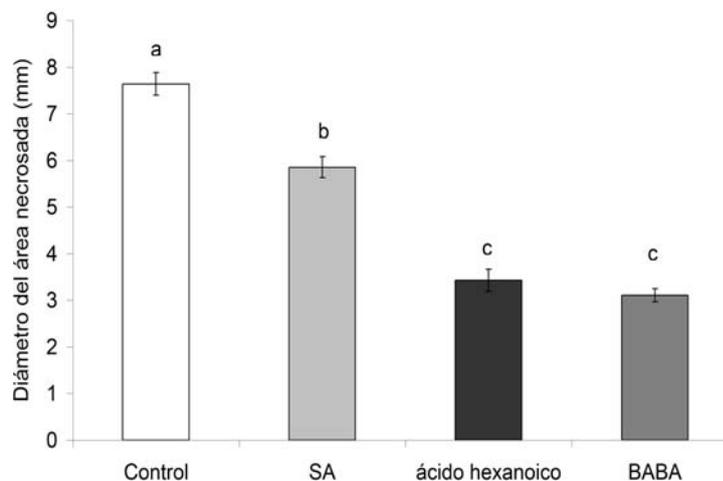


Figura 27. Comparación de la efectividad del ácido hexanoico con la de otros inductores.

Plantas de tomate cv. Ailsa Craig de 4 semanas de desarrollo se trataron 48 h por vía radicular con ácido hexanoico 0,6 mM, con SA 0,5 mM o con BABA 0,5 mM. Posteriormente se inocularon con *Botrytis cinerea* y 72 h después se midió el área de necrosis en los puntos de inoculación. Las barras muestran la media del diámetro de necrosis en un experimento representativo (n=10) \pm el error estándar para cada tratamiento. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) están indicadas con letras.

Efecto del ácido hexanoico sobre la acumulación de calosa

Se analizó la presencia de la calosa, un polisacárido de defensa, en plantas de tomate cv. Ailsa Craig de 4 semanas de desarrollo, tratadas y no tratadas con ácido hexanoico 0,6 mM, 72 h después de la inoculación con *B. cinerea*. Como control positivo se utilizaron plantas tratadas con BABA, ya que se había demostrado previamente que este compuesto inducía la acumulación de calosa frente a necrótrofos, en *Arabidopsis* (Ton & Mauch-Mani, 2004). Se comprobó que el tratamiento previo con ácido hexanoico indujo la acumulación de calosa alrededor del área de infección, a un nivel comparable al observado en plantas tratadas con el inductor BABA (Figura 28).

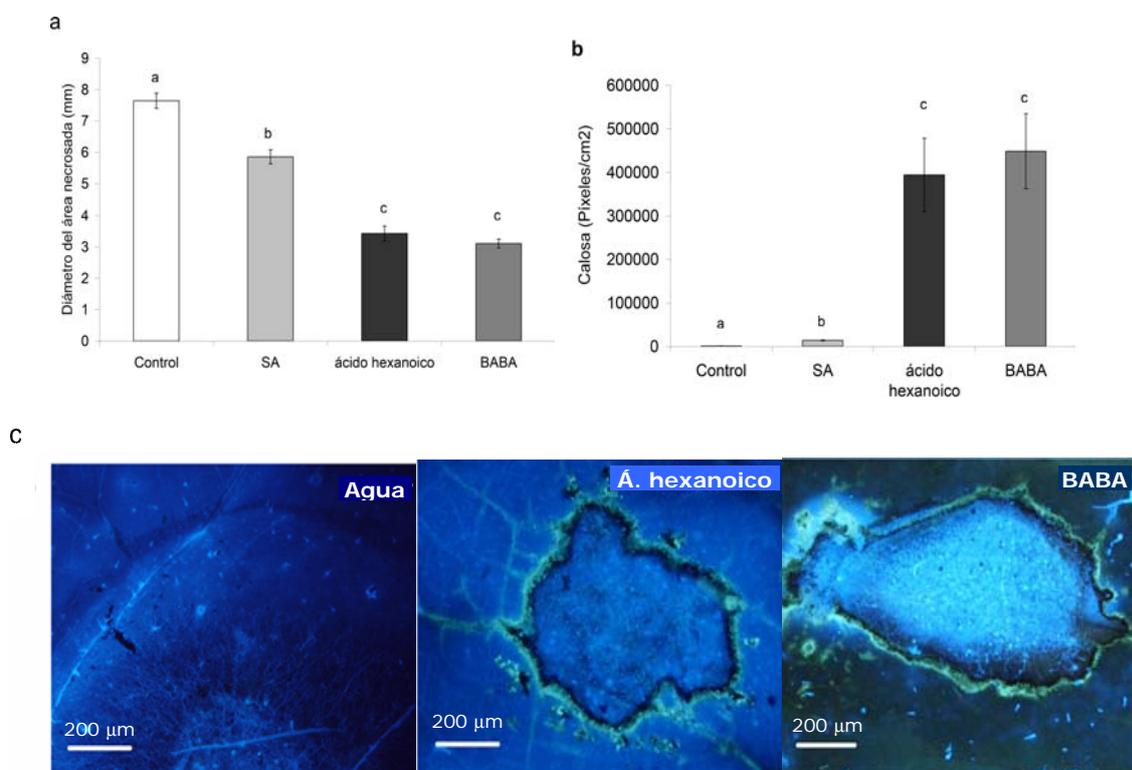


Figura 28. Acumulación de calosa en plantas tratadas con ácido hexanoico tras la infección con *B. cinerea*. (Figura 28a) Plantas de tomate (cv. Ailsa Craig) de 4 semanas de desarrollo Se trataron 48 h por vía radicular con solución hidropónica (control), ácido hexanoico 0,6 mM, SA 0,5 mM o BABA 0,5 mM. Posteriormente se inocularon con esporas de *B. cinerea* y 72 h.p.i. se midió el área de necrosis en las hojas inoculadas. Las barras muestran la media de pixeles de calosa relativos al área total de todas las imágenes microscópicas de cada foliolo analizado de un experimento representativo (n=10) \pm el error estándar para cada tratamiento. Los grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí (p-valor<0,05) están indicados con letras. (Figura 28a) Se realizó una doble tinción con calcofluor y azul de anilina para visualizar la calosa por microscopía de fluorescencia. La calosa depositada se cuantificó mediante análisis de imagen. (Figura 28c) Imágenes microscópicas ilustrativas de la calosa en hojas infectadas por *B. cinerea* tras los diferentes tratamientos con inductores.

El hecho de que el tratamiento con BABA indujera la acumulación de calosa en plantas de tomate tras la infección con *B. cinerea* es consistente con lo observado previamente en *Arabidopsis* frente a otros necrótrofos (Ton & Mauch-Mani, 2004). Asimismo, se determinó que el tratamiento con SA no estimulaba la producción de calosa tras la infección con *B. cinerea* (dato no mostrado), apoyando las observaciones previas en *Arabidopsis*, que indicaban que la activación de la ruta del SA antagoniza con la síntesis de calosa (Nishimura y col., 2003; Ton & Mauch-Mani, 2004).

Hay que destacar que las plantas no tratadas (cv. Ailsa Craig), utilizadas como control, no acumularon calosa en respuesta a la infección, indicando que este polisacárido no constituye un mecanismo basal de respuesta frente a este patógeno en el cultivar utilizado. Por otra parte, el hecho de que el ácido hexanoico, al igual que el BABA, no produjera la acumulación de calosa previamente a la infección en las plantas tratadas (datos no mostrados), indicó que el efecto producido por ambos compuestos puede considerarse del tipo cebado o *priming* (katz y col., 1998; Conrath y col., 2001).

Para confirmar que la acumulación de calosa constituía uno de los mecanismos por los cuales el ácido hexanoico confería resistencia a las plantas de tomate frente a *B. cinerea*, se utilizó el compuesto 2-desoxi-D-glucosa (DDG), un inhibidor de la síntesis de calosa. Las plantas fueron tratadas localmente con dicho compuesto, previamente a la inoculación con el hongo (Figura 29). Los resultados obtenidos revelaron que la aplicación del DDG redujo considerablemente la deposición local de calosa en respuesta a la infección (Figura 29a). Asimismo, se comprobó que se reducía significativamente el efecto protector del ácido hexanoico (Figura 29b), aunque no se recuperó totalmente el fenotipo de las plantas no tratadas.

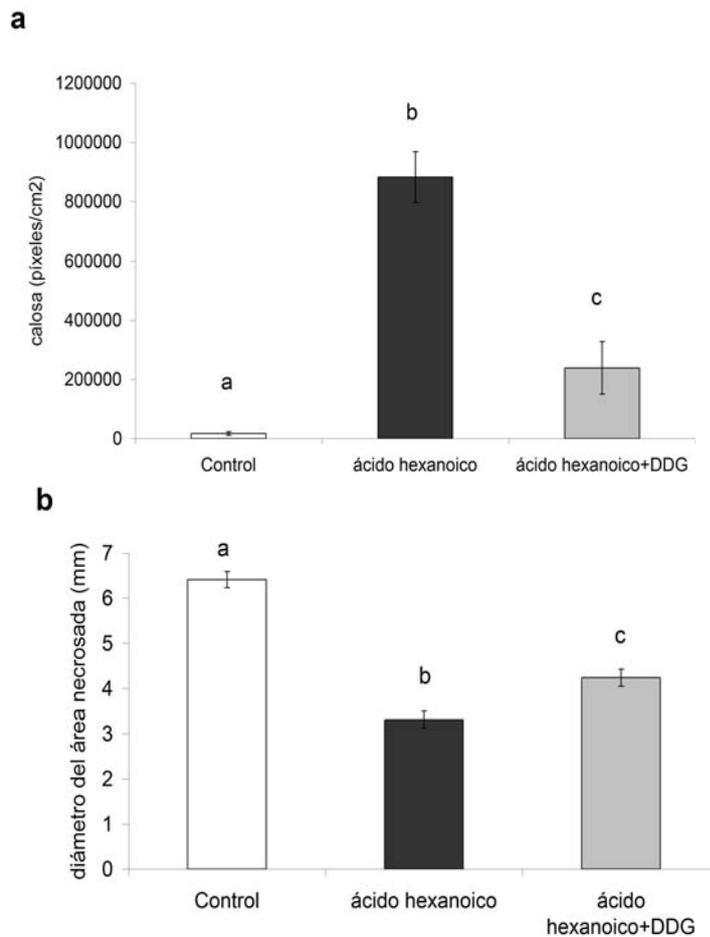


Figura 29. Efecto de la inhibición de la síntesis de calosa en la resistencia del tomate inducida por ácido hexanoico. Se trataron plantas de tomate cv. Ailsa Craig de 4 semanas de desarrollo con ácido hexanoico 0, 6 mM por vía radicular durante 48 h. El DDG se aplicó por infiltración en las hojas y 24 h después se inocularon con *B. cinerea*. (Figura 29a) La calosa se visualizó mediante tinción con azul de anilina y microscopía de fluorescencia a las 72 h.p.i. Las barras muestran la media de píxeles de calosa relativos al área total de todas las imágenes microscópicas de cada foliolo analizado de un experimento representativo (n=10) \pm el error estándar para cada tratamiento. (Figura 29b) La resistencia se cuantificó midiendo el área de necrosis a las 96 h.p.i. Las barras muestran la media del diámetro del área de necrosis \pm el error estándar para cada tratamiento. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí (p-valor < 0,05) están indicadas con letras.

Efecto del ácido hexanoico sobre las rutas de señalización hormonal que participan en la resistencia a patógenos

Para determinar si el efecto inductor producido por el ácido hexanoico estaba relacionado con las rutas de señalización hormonal, implicadas en las defensas de las plantas frente a patógenos, se analizó mediante RT-Q-PCR en tiempo real la expresión de genes marcadores de las rutas mediadas por SA y JA. En concreto, se analizó el nivel de expresión de los genes *PR1* (ruta del SA) y *LoxD* (ruta del JA). En el primer capítulo de la presente tesis se ha demostrado la inducción de ambos genes en plantas de tomate infectadas con *B. cinerea*.

Se analizaron plantas tratadas con ácido hexanoico, antes y después de ser inoculadas con *B. cinerea*. También se analizaron plantas tratadas con los inductores SA y BABA. Se comprobó que el tratamiento con ácido hexanoico no producía un aumento significativo en la cantidad del transcrito de *PR1* tras la infección, comparado con las plantas no tratadas (Figura 30a).

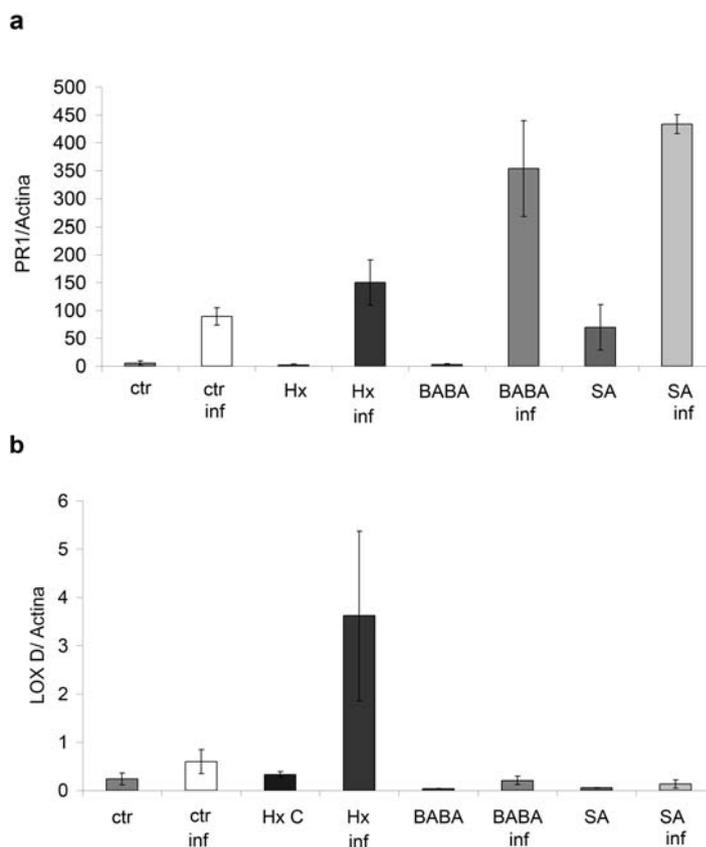


Figura 30. Niveles de expresión de *PR1* y *LoxD* en plantas de tomate tratadas con ácido hexanoico y otros inductores. Se trataron plantas de tomate (cv. Ailsa Craig) de 4 semanas de desarrollo durante 48 h por vía radicular con ácido hexanoico 0, 6 mM, BABA 0,5 mM o SA 0,5 mM. Posteriormente se inocularon con *B. cinerea* y 72 h.p.i. se extrajo el RNA total que se analizó mediante RT-Q-PCR. Los niveles de transcrito de *PR1* (Figura 30a) y de *LoxD* (Figura 30b) se normalizaron con relación a la expresión del gen de la actina medida en la misma muestra. Los datos están representados en escala logarítmica y son el resultado de la media de 2 réplicas técnicas de un experimento representativo \pm el error estándar para cada tratamiento. Los experimentos fueron repetidos dos veces.

En cambio, el tratamiento con ácido salicílico, como cabía esperar, produjo un incremento considerable en la expresión de *PR1* en respuesta a la infección. En nuestras condiciones experimentales el BABA produjo un incremento en la expresión de *PR1* en plantas inoculadas con *B. cinerea*, en comparación con las plantas no tratadas (Figura 30a). Este resultado confirma en tomate el efecto producido por el BABA en plantas de *Arabidopsis*, frente a *B. cinerea* (Zimmerli, 2001).

En cuanto al gen *LoxD*, marcador de la ruta del JA, se comprobó que el ácido hexanoico incrementaba significativamente su expresión en respuesta a *B. cinerea*, sugiriendo una posible conexión entre esta ruta de transducción de señal y la resistencia inducida por el ácido hexanoico (Figura 30b). El tratamiento con SA no afectó significativamente la expresión de *LoxD*, con respecto a las plantas control, en respuesta al patógeno (Figura 30b). El BABA no alteró la expresión de este gen, sugiriendo que en tomate el efecto protector ejercido por este inductor no está mediado por la ruta del JA, tal como se había observado previamente en *Arabidopsis* (Zimmerli y col 2001).

Por tanto, los resultados obtenidos sugerían la implicación de la ruta mediada por el JA en el efecto inductor del ácido hexanoico en tomate. Para confirmar esta hipótesis, se utilizó el mutante *defenseless-1 (def1)* (Howe y col., 1996), que es deficiente en la acumulación de JA, ya que tiene bloqueada la ruta de síntesis de dicha hormona (Li y col., 2002).

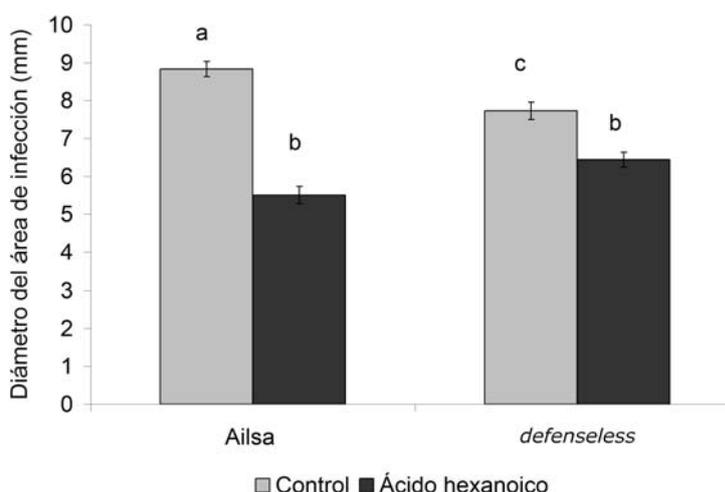


Figura 31. Efecto de la deficiencia en la ruta mediada por JA sobre la resistencia inducida por el ácido hexanoico. Se trataron durante 48 h plantas de tomate (cv. Ailsa Craig) y del mutante *def1 (defenseless-1)* de 4 semanas de desarrollo por vía radicular con ácido hexanoico 0,6 mM. Posteriormente se inocularon con *B. cinerea* y 72 h.p.i. se determinó la resistencia midiendo el diámetro del área necrosada en los puntos de inoculación. Las barras muestran la media del diámetro de necrosis de dos experimentos (n=10) ± el error estándar para cada tratamiento. Las medias estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) están indicadas con letras.

Tanto las plantas control (cv. Ailsa Craig), como las plantas *def1*, se trataron con ácido hexanoico y posteriormente se inocularon con *B. cinerea*. Como se observa en la Figura 31, el tratamiento con ácido hexanoico protegió frente a *B. cinerea* en ambos casos, aunque la mutación redujo significativamente el efecto inductor con respecto a las plantas control. Estos resultados, aunque no son concluyentes, indican que la ruta mediada por JA no parece desempeñar un papel esencial en la protección ejercida por el hexanoico. Es interesante destacar que el mutante sin

tratar resultó ser significativamente más resistente al ataque de *B. cinerea* en nuestras condiciones experimentales, lo que dificulta el análisis del efecto inductor del ácido hexanoico. Este fenotipo de resistencia difiere de los resultados obtenidos previamente por otros autores, que observaron que el mutante *def-1* mostraba el fenotipo de las plantas silvestres (Audenaert y col., 2002b) o era ligeramente más susceptible a la infección (Díaz y col., 2002)

Implicación de la ruta mediada por el ácido abscísico en la resistencia inducida por el ácido hexanoico

En los últimos años se ha demostrado la importancia del ácido abscísico (ABA) como molécula señalizadora en las interacciones planta-patógeno (Kettner & Dörffling, 1995; Flors y col., 2005; Mauch-Mani & Mauch, 2005). En tomate se había observado un incremento en los niveles de ABA tras la infección con *B. cinerea*, así como un aumento de la susceptibilidad de las plantas tras su aplicación exógena (Kettner & Dörffling, 1995). Posteriormente se demostró que el ABA constituía un factor de susceptibilidad, ya que plantas del mutante de tomate *sitiens*, que son deficientes en ABA, eran más resistentes a *B. cinerea* (Audenaert, 2002b). Para comprobar si el ABA estaba implicado en la resistencia inducida por el ácido hexanoico, se realizaron infecciones con *B. cinerea* de plantas del mutante *flacca* (*flc*), deficiente en la ruta de síntesis del ABA (Figura 32).

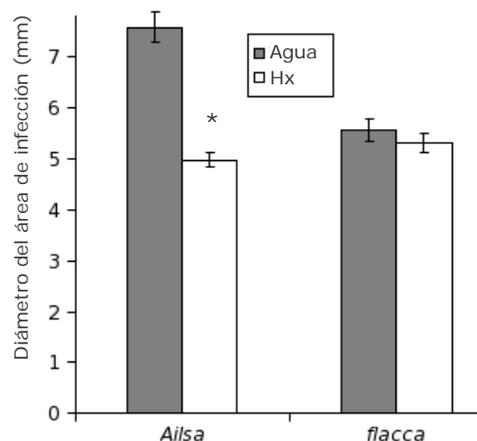


Figura 32. Efecto de la deficiencia en la síntesis del ácido abscísico sobre la resistencia inducida por el ácido hexanoico. Se trataron plantas de tomate (cv. Ailsa Craig) y plantas del mutante *flacca* de 4 semanas de desarrollo por vía radicular con ácido hexanoico 0,6 mM. Después de 48 h se inocularon las plantas con *B. cinerea* y tras 72 h de infección se midió el área de necrosis en los puntos de inoculación. Las barras muestran la media del diámetro de necrosis en un experimento representativo (n=20) ± el error estándar para cada tratamiento. Las diferencias de las medias de diámetro de necrosis entre las plantas tratadas y las no tratadas estadísticamente significativas ($p < 0,05$), se ha indicado mediante un asterisco (*).

Consistentemente con las observaciones previas, este mutante resultó ser más resistente a la infección por *B. cinerea*. El resultado más interesante fue el obtenido al tratar este mutante con ácido hexanoico, puesto que el tratamiento no indujo resistencia a *B. cinerea*, sugiriendo que el ABA jugaba un papel en la actividad inductora del ácido hexanoico (Figura 32).

Caracterización de la actividad antifúngica del ácido hexanoico

Dado que el ácido hexanoico parecía ejercer un doble efecto como inductor y como fungicida en el control de *B. cinerea*, dependiendo de la concentración utilizada, se diseñaron diversos experimentos para caracterizar la capacidad antifúngica del ácido hexanoico.

Estudio del efecto del ácido hexanoico sobre la germinación de esporas de B. cinerea a distintos pHs

Para analizar el efecto del pH sobre la efectividad del ácido hexanoico se incubaron las esporas en medio PDB, con concentraciones crecientes del compuesto.

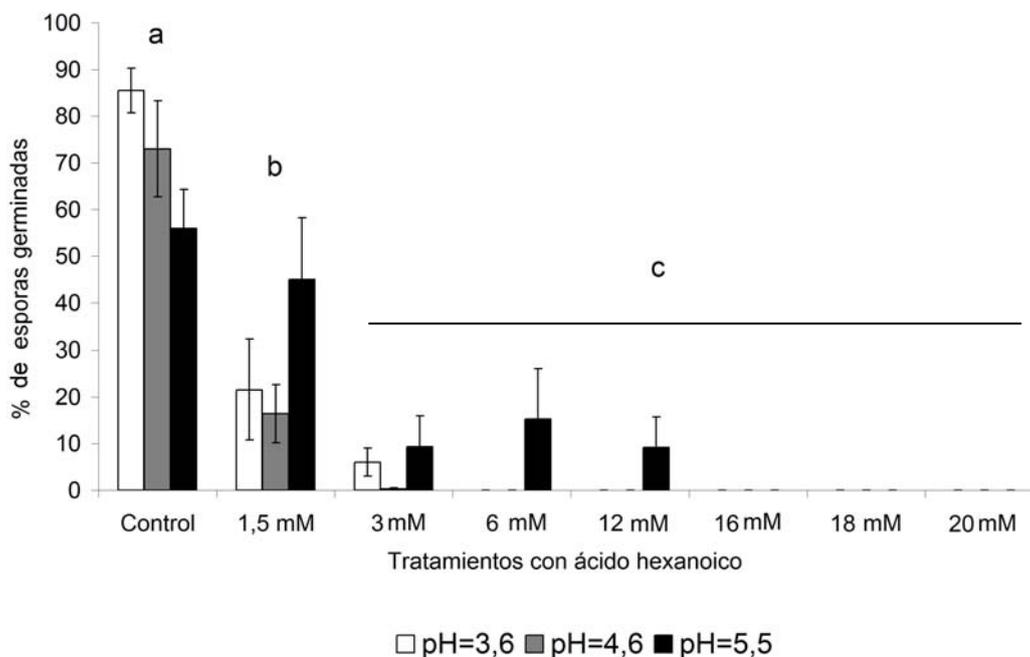


Figura 33. Efecto del ácido hexanoico sobre la germinación de esporas de *B. cinerea*. Dependencia de la concentración y del pH del medio. El porcentaje de germinación se determinó por observación microscópica de esporas de *B. cinerea*, tras 24 h de incubación en medio PDB o con diferentes concentraciones de ácido hexanoico en PDB, ajustado a tres pHs distintos. Las barras muestran la media de los porcentajes de germinación de cuatro experimentos independientes \pm el error estándar para cada tratamiento. Los grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) respecto de los tratamientos están indicados con letras.

Para cada concentración de ácido hexanoico el medio se ajustó a tres pHs distintos: un pH similar al pKa del ácido hexanoico (pKa= 4,75) y un pH alrededor de una unidad por encima y por debajo del pKa. A las 24h se determinó, mediante observación microscópica, el porcentaje de esporas germinadas en cada caso, con respecto a un control constituido por esporas incubadas en medio PDB (Figura 33). Se estimó que la MCI para el ácido hexanoico era 16 mM, a cualquiera de los pHs analizados, siendo también este el valor de la MCF.

Aunque las diferencias en el porcentaje de germinación con respecto al pH no resultaron estadísticamente significativas, el análisis microscópico de las muestras indicó que la actividad inhibitoria del ácido hexanoico sí parece depender del pH del medio a concentraciones inferiores a la MCF, observándose un retraso en el hinchamiento de las esporas y en el desarrollo del tubo germinativo a los pHs más bajos (Figura 34). Sólo se observó la completa inhibición de la germinación al tratar con ácido hexanoico 16 mM, a todos los pHs ensayados. En estas condiciones no se desarrolló el tubo germinativo y se observó una retracción del citoplasma de la espora (Figura 34).

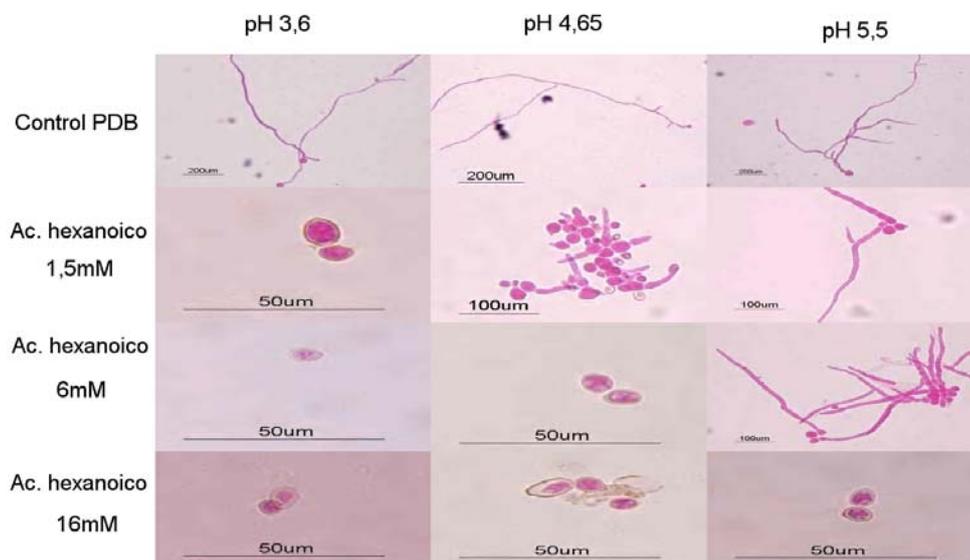


Figura 34. Análisis microscópico de la germinación de esporas de *B. cinerea* en presencia de ácido hexanoico. Dependencia de la concentración y del pH del medio. Esporas de *B. cinerea* fueron incubadas durante 24 h en medio PDB (control) o con diferentes concentraciones de ácido hexanoico en medio PDB, a tres pHs distintos, y posteriormente teñidas con lactofucsina para su observación microscópica.

Tras incubar 7 días las esporas tratadas y no tratadas se comprobó que a concentraciones inferiores a la MFC sólo se producía un retraso en la germinación,

ya que en esas condiciones las esporas finalmente germinaban y desarrollaban micelio. Éste fue filtrado, secado y pesado y los datos obtenidos se muestran en la Figura 35. Este resultado confirmó que a concentraciones inferiores a la MCF el ácido hexanoico no produce una inhibición completa sino un retraso en la germinación de las esporas de *B. cinerea*.

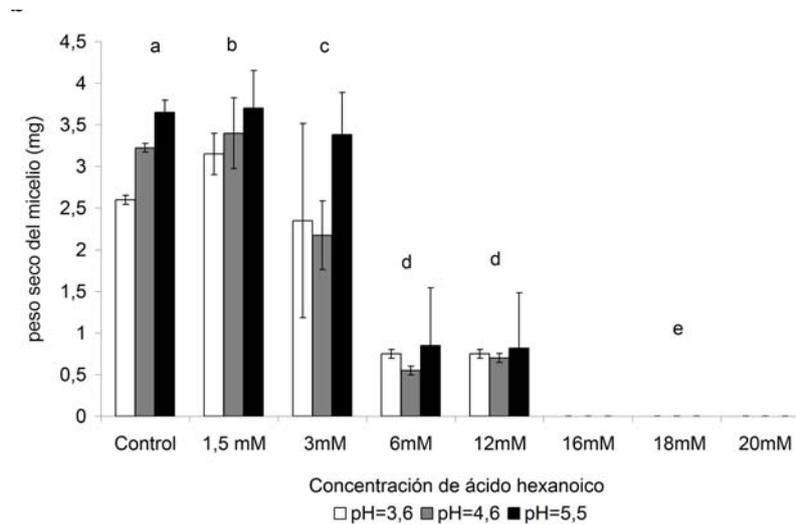


Figura 35. Desarrollo del micelio a partir de esporas de *Botrytis cinerea* tratadas con diferentes concentraciones de ácido hexanoico. Esporas de *B. cinerea* fueron incubadas en medio PDB o con diferentes concentraciones de ácido hexanoico en medio PDB, a diferentes pHs durante 7 días. El micelio obtenido se analizó mediante filtrado y secado hasta obtener un peso constante. Las barras muestran la media del peso seco obtenido en cuatro experimentos independientes \pm el error estándar para cada tratamiento. Los grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) respecto de los tratamientos, están indicados con letras

Estudio del efecto sobre el crecimiento del micelio

Para estudiar el efecto del ácido hexanoico sobre el crecimiento del micelio, se incubaron esporas, previamente germinadas, en medio PDB conteniendo distintas concentraciones de ácido hexanoico. Dado que el análisis microscópico de las esporas había indicado previamente que el pH podía influir en la eficacia del tratamiento, el medio se ajustó a pH 5,5, que es el más alto del rango ensayado, con el fin de determinar su efecto en las condiciones más restrictivas (Figura 36).

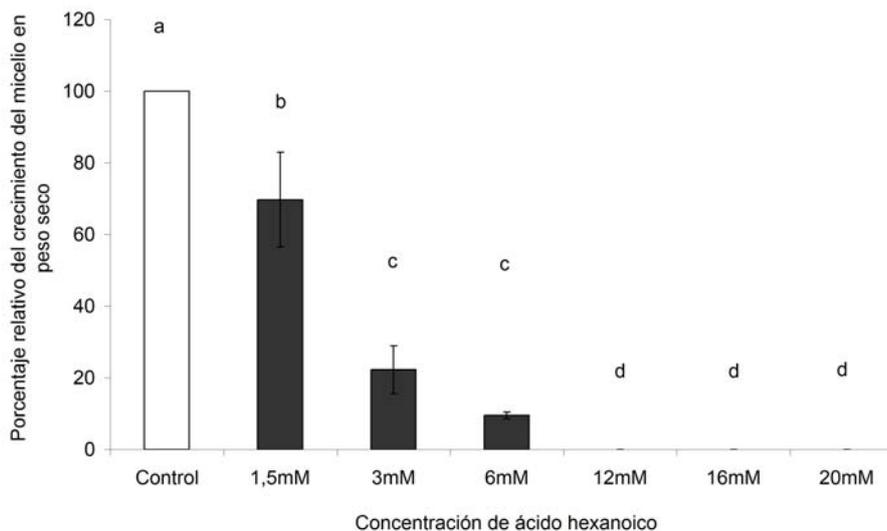


Figura 36. Efecto del ácido hexanoico sobre el crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea*. Esporas de *B. cinerea* se incubaron durante 24 h en medio PDB y una vez confirmada la germinación de las mismas, se incubaron con diferentes concentraciones de ácido hexanoico en medio PDB, a pH 5,5. Las esporas incubadas en PDB fueron utilizadas como control. Se analizó el micelio obtenido tras 5 días de incubación, mediante filtrado y secado hasta obtener un peso constante. Las barras muestran la media del porcentaje del peso seco respecto del control, de tres experimentos independientes \pm el error estándar para cada tratamiento. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí (p -valor $< 0,05$) respecto de los tratamientos, están indicadas con letras.

Se comprobó que el tratamiento con ácido hexanoico redujo significativamente el crecimiento del micelio a todas las concentraciones ensayadas, incluso a concentraciones 10 veces inferiores a la MCF (Figura 36). A concentraciones 5 veces inferiores a la MCF, redujo el desarrollo del micelio en un 70%. Los resultados obtenidos demuestran que el ácido hexanoico también inhibe el desarrollo del micelio, una vez que las esporas ya han germinado.

Efecto sobre la integridad de las membranas de B. cinerea

Se estudió el efecto producido por el tratamiento con ácido hexanoico sobre las membranas del hongo. Para ello se trataron esporas previamente germinadas con una concentración fungicida, utilizando el tratamiento con liticasa como control positivo (Jewell y col., 2002), tal como se ha indicado en el primer apartado de Resultados de este capítulo. Después de los distintos tratamientos, las esporas se tiñeron con lactofucsina y se observaron al microscopio (Figura 37).

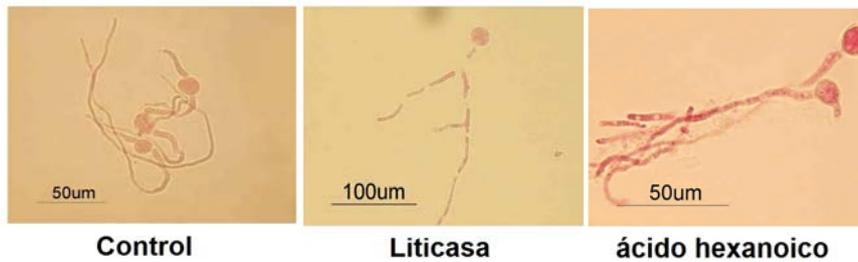


Figura 37. Efecto del ácido hexanoico sobre la integridad de las membranas de *B. cinerea*. Esporas de *B. cinerea*, previamente germinadas, fueron incubadas en medio BSG (Control), en presencia de liticasa (Liticasa), o en presencia de ácido hexanoico 30 mM (ácido hexanoico). Tras 2 h de incubación, cada muestra fue teñida con lactofucsina y se procedió a su observación mediante microscopía óptica.

Se comprobó que el ácido hexanoico no producía la fragmentación de las membranas de *B. cinerea*, que sí se observaba en las esporas tratadas con liticasa, en las que el tubo germinativo aparecía septado. Sin embargo, tras el tratamiento con ácido hexanoico se observaron granulaciones en el interior de la espora y del tubo germinativo (Figura 37).

Efecto sobre la permeabilidad de la membrana celular de B. cinerea

Se determinó si el tratamiento con ácido hexanoico alteraba la permeabilidad de la membrana, analizando la salida de iones fosfato al medio (ver Materiales y Métodos). Para ello, se trataron esporas de *B. cinerea*, previamente germinadas, con una concentración fungicida de ácido hexanoico y se determinó el contenido en iones fosfato del medio extracelular. Se utilizó como control positivo el tratamiento con una saponina, que altera la permeabilidad de la membrana del hongo (Mendoza col., 1997).

Como se observa en la Figura 38a, el tratamiento con ácido hexanoico incrementó la salida de iones fosfato al medio, sugiriendo que la alteración de la permeabilidad de la membrana podría constituir uno de los mecanismos en los que se basa su actividad fungicida.

El efecto sobre la permeabilidad de la membrana se confirmó tiñendo con eosina las esporas, una vez sometidas a los distintos tratamientos. Se comprobó que las esporas tratadas tanto con saponina, como con ácido hexanoico, se teñían con el colorante vital, mientras que las esporas no tratadas no incorporaron el colorante (Figura 38b).

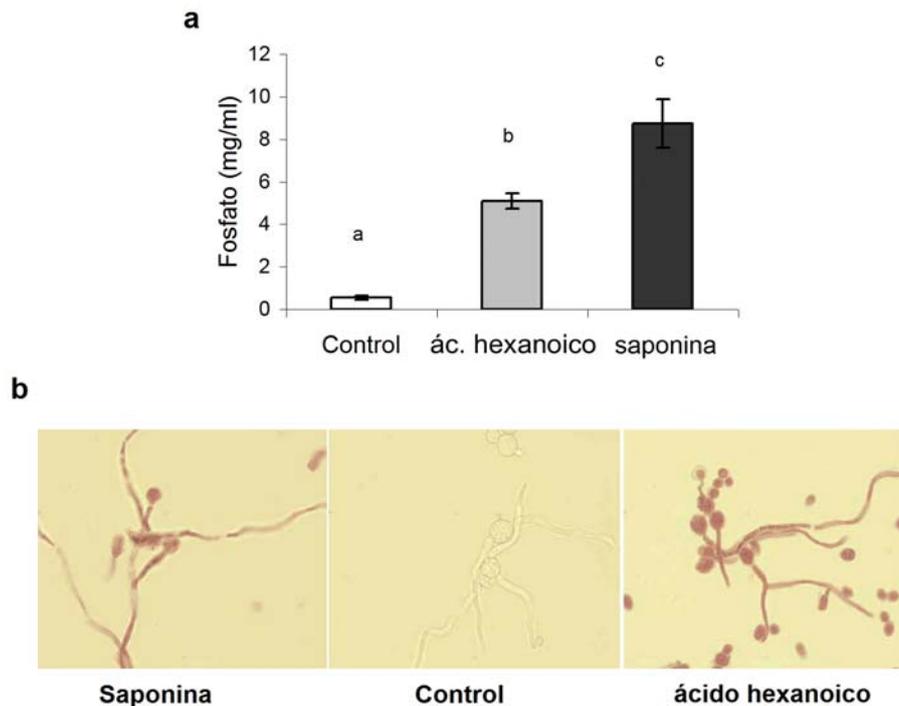


Figura 38. Efecto del ácido hexanoico sobre la permeabilidad de las membranas de *B. cinerea*. **Figura 38a:** micelio de *B. cinerea* crecido en PDB durante tres días se incubó en tampón Tris (control), en presencia de saponina (Saponina) o en presencia de ácido hexanoico 20 mM durante 6 h (ácido hexanoico) y se midió la concentración de fosfato en el medio de incubación, mediante cromatografía de intercambio iónico. Las barras muestran la media de los valores obtenidos en 4 réplicas \pm el error estándar para cada tratamiento. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) respecto de los tratamientos, están indicadas con letras. **Figura 38b** Las esporas germinadas fueron incubadas en los medios mencionados en la Figura 38a, durante 6 h y cada muestra fue teñida con eosina básica, para su observación mediante microscopía óptica.

Comparación de la eficacia como fungicida del ácido hexanoico con fungicidas comerciales

Se analizó la germinación *in vitro* de esporas de *Botrytis cinerea* incubadas durante 24 h en presencia de los fungicidas comerciales fosetil-aluminio, tebuconazol y benomilo, a las concentraciones de uso recomendadas por los fabricantes (8,5 mM, 8 mM y 1,7 mM respectivamente) y se comparó con la germinación observada tras la incubación con ácido hexanoico a la MCF (16 mM). En este estudio se incluyó también el tratamiento con AAME (16 mM). Tras los tratamientos se determinó el porcentaje de esporas germinadas en cada caso, mediante análisis microscópico (Figura 39a).

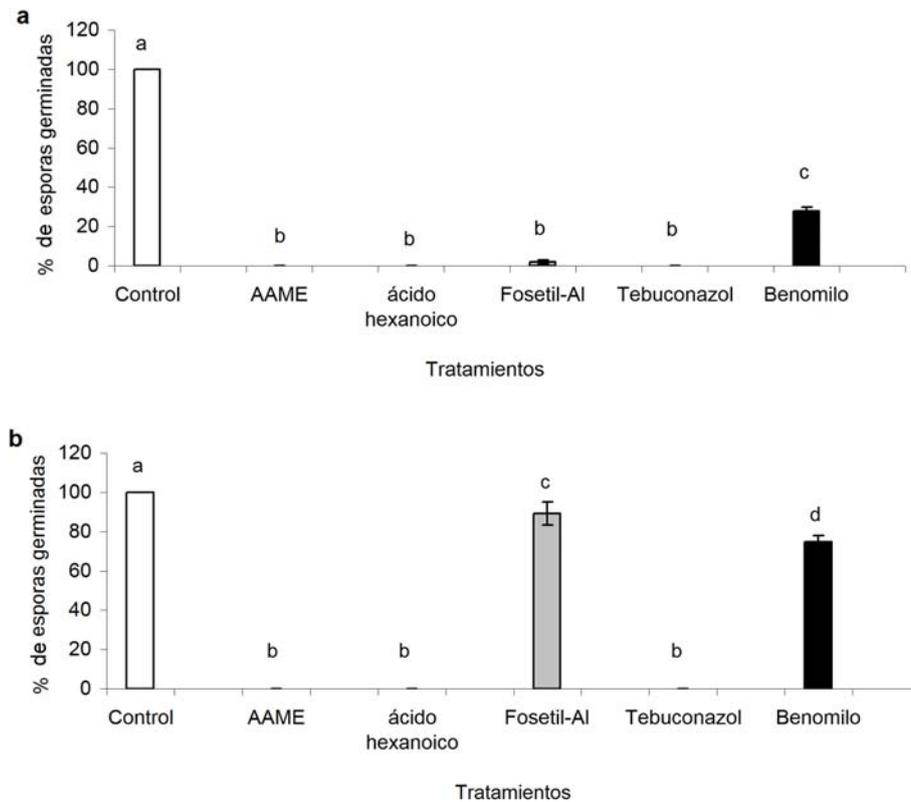


Figura 39. Comparativa de la eficacia del ácido hexanoico y del AAME con la de fungicidas comerciales. Efecto sobre la germinación de las esporas. Figura 39a: Esporas de *B. cinerea* se incubaron durante 24 h con ácido hexanoico, AAME y los distintos fungicidas comerciales. Posteriormente se determinó el porcentaje de germinación de las esporas mediante observación microscópica. Figura 39b: Se determinó el porcentaje de germinación de las esporas tratadas, una vez eliminado el compuesto, tras su incubación durante 24 h en medio PDB. Los experimentos se hicieron por duplicado. Las barras muestran la media de los porcentajes de germinación de dos réplicas técnicas de un experimento representativo \pm el error estándar para cada tratamiento. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) respecto de los tratamientos, están indicadas con letras.

Asimismo, se determinó la irreversibilidad de los distintos tratamientos tratando las esporas durante 24 h con cada compuesto y lavándolas varias veces para eliminarlo. Posteriormente las esporas se inocularon en medio PDB y tras 24h de incubación se determinó el porcentaje de germinación (Figura 39b). En estas condiciones el ácido hexanoico y el AAME, a la MCF, inhibieron por completo y de forma irreversible, la germinación de las esporas de *B. cinerea*, al igual que el tebuconazol, a la concentración utilizada en la práctica (Figura 39a). En el caso del tratamiento con benomilo se produjo un retraso en la germinación de las esporas, presentando un tubo germinativo menos desarrollado que las esporas no tratadas. También se observó que el tratamiento con benomilo producía la retracción del citoplasma de las esporas, como ocurre al tratar con ácido hexanoico y con AAME, mientras que este fenómeno no se observó con el tebuconazol y el fosetil-alumino (datos no mostrados).

Se pudo comprobar que el fosetil-aluminio y el benomilo producían un retraso en la germinación de las esporas ya que, tras siete días de incubación en los respectivos tratamientos, se desarrolló el micelio, aunque en menor proporción que en las esporas no tratadas (Figura 40).

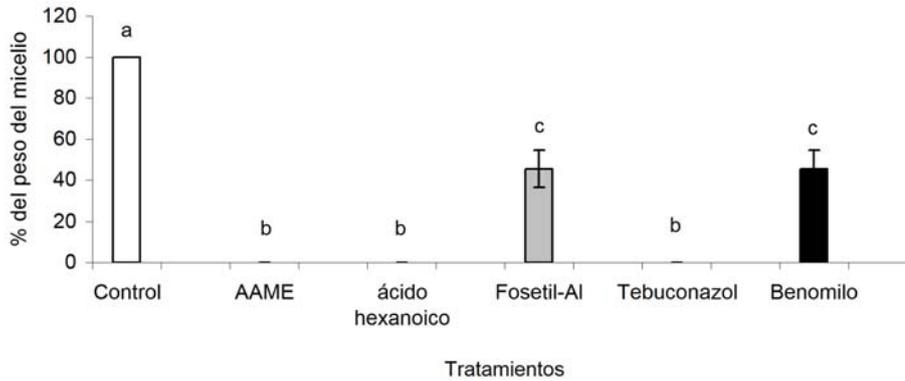


Figura 40. Comparativa de la eficacia del ácido hexanoico y del AAME con la de fungicidas comerciales. Efecto a largo plazo. Se incubaron durante 7 días esporas de *B. cinerea* en medio PDB con los diferentes compuestos fungicidas y se estimó el micelio desarrollado, una vez filtrado y secado hasta peso constante. Las barras muestran la media del peso seco de cuatro experimentos independientes \pm el error estándar para cada tratamiento. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) están indicadas con letras.

También se analizó el efecto producido por los distintos tratamientos sobre el desarrollo del micelio, a partir de esporas ya germinadas. Para ello se incubaron esporas de *B. cinerea* en medio PDB durante 24 h y una vez confirmada la germinación de éstas mediante análisis microscópico, se sometieron a los distintos tratamientos. Transcurridos 5 días se determinó el peso seco del micelio desarrollado en cada caso (Figura 41).

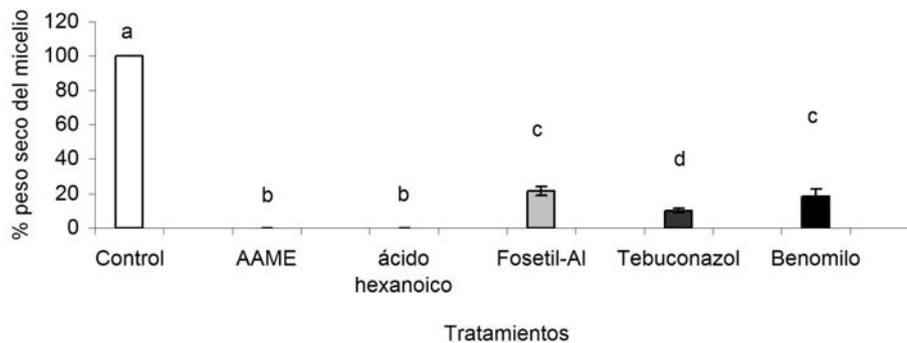


Figura 41. Comparativa de la eficacia del ácido hexanoico y del AAME con la de fungicidas comerciales. Efecto sobre el crecimiento del micelio de *B. cinerea*. Esporas germinadas en PDB fueron tratadas durante 5 días con ácido hexanoico, AAME y los fungicidas comerciales. Se determinó el micelio obtenido, una vez filtrado y secado hasta peso constante. Las barras muestran la media del porcentaje del peso seco respecto del control, de dos experimentos independientes (2 réplicas técnicas por experimento) \pm el error estándar para cada tratamiento. Las medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) están indicadas con letras.

El ácido hexanoico y el AAME inhibieron completamente el crecimiento del micelio, como cabía esperar al utilizar la MCF y en esas condiciones experimentales los fungicidas comerciales analizados inhibieron significativamente el crecimiento del micelio, reduciendo su peso seco hasta en un 80-90%, con respecto al control no tratado (Figura 41).

Eficacia del efecto inhibitorio del ácido hexanoico sobre la germinación de esporas de B. cinerea inoculadas en un soporte biológico

Inoculación de esporas tratadas con ácido hexanoico en hojas de tomate

Una vez demostrada la actividad fungicida del ácido hexanoico *in vitro*, se estudió si dicho efecto se mantenía sobre un huésped, como la hoja de tomate. Se trataron durante 2 h esporas de *B. cinerea* con ácido hexanoico, a una concentración fungicida (16 mM) y a una concentración no fungicida (3 mM), utilizando como control esporas incubadas en medio PDB. Posteriormente, las esporas se inocularon en hojas aisladas de plantas de tomate (cv. Ailsa Craig) de 4 semanas de desarrollo y se monitorizó el avance de la infección, midiendo el diámetro de la necrosis a distintos tiempos (Figura 42). Asimismo, para comprobar la irreversibilidad del tratamiento en estas condiciones, una parte de las esporas tratadas con ácido hexanoico 16 mM fue sometida a sucesivos lavados, para eliminar el tratamiento y posteriormente las esporas fueron inoculadas (Figura 42).

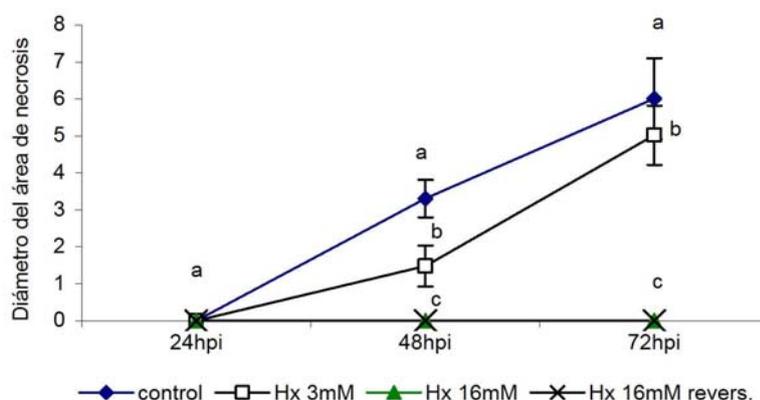


Figura 42. Inoculación de hojas de tomate con esporas de *B. cinerea* tratadas con ácido hexanoico. Se inocularon hojas cortadas de plantas de tomate cv. Ailsa Craig de 4 semanas de desarrollo, con esporas de *B. cinerea* previamente tratadas con agua (control), con ácido hexanoico 3 ó 16 mM, o tratadas con ácido hexanoico 16 mM y posteriormente lavadas para eliminar el tratamiento (16 mM revers). Los puntos indican la media del diámetro de la zona necrosada (n=20) tras 24, 48 y 72 h.p.i. \pm el error estándar para cada tratamiento. Los grupos de medias de diámetro de necrosis estadísticamente diferentes con respecto a al tratamiento en cada tiempo de infección están indicados con letras ($p < 0,05$).

Las esporas tratadas con ácido hexanoico a la MCF no fueron capaces de colonizar las hojas de tomate, incluso después de haber sido eliminado el compuesto, confirmando que el efecto del tratamiento es irreversible en un contexto biológico.

Inoculación de esporas tratadas con ácido hexanoico en frutos de tomate

Se escogieron frutos de tomate cosechados como soporte biológico. Fueron lavados y esterilizados en su superficie mediante baño con lejía al 10% (v/v). A continuación, se les practicaron 4 incisiones en el pericarpio de la zona ecuatorial. Una parte de los frutos fueron inoculados en cada herida con 5 μ L de una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 4×10^6 esporas/ml en agua (Control infectado). Otros frutos fueron inoculados con esporas tratadas durante 2 h con ácido hexanoico 16 mM (ácido hexanoico) y otros frutos fueron inoculados con esporas tratadas con ácido hexanoico 16 mM y posteriormente sometidas a sucesivos lavados para eliminar el tratamiento (ácido hexanoico lavado). Los frutos control fueron inoculados con agua estéril (Control agua).

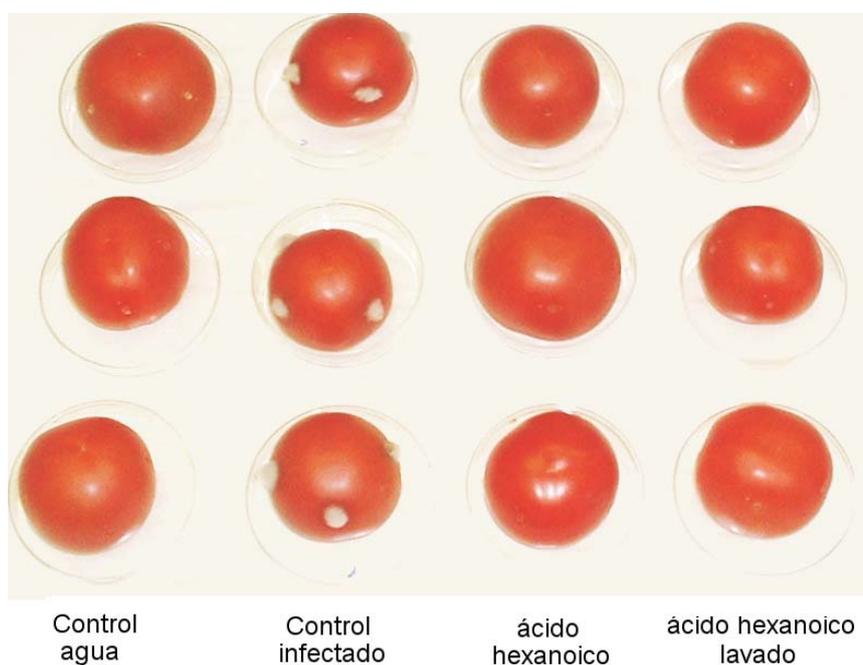


Figura 43. Inoculación en frutos de tomate de esporas tratadas con ácido hexanoico. Se utilizaron 8 tomates maduros cv. Ailsa Craig para cada tratamiento. Cada grupo fué inoculado con agua (control agua) o con esporas de *Botrytis cinerea* previamente incubadas durante 2 h en agua (control infectado), ácido hexanoico 16 mM o con esporas que habían sido también incubadas con ácido hexanoico a la misma concentración, pero sometidas posteriormente a varios lavados para eliminar el tratamiento (ácido hexanoico lavado). El experimento fué ensayado por duplicado. La imagen ilustra el aspecto de los frutos tras dicho experimento.

En nuestro sistema la necrosis del pericarpio alrededor de la herida aparece a las 48 h, a las 72 h todas las heridas están infectadas y el micelio de *B. cinerea* se ha desarrollado. A las 96 h la necrosis es de alrededor de 1-1,5 cm de diámetro, aproximadamente (figura 43, Control infectado).

Sin embargo, a las 96 h no se observaron síntomas de infección en aquellos frutos inoculados con esporas tratadas previamente con ácido hexanoico 16 mM, incluso después de haber eliminado el tratamiento mediante lavado de las esporas (Figura 43, ácido hexanoico lavado). Estos resultados demuestran que el ácido hexanoico no sólo inhibe la germinación y el crecimiento de *B. cinerea in vitro*, sino que también es eficaz cuando las esporas se inoculan en fruto de tomate. Este efecto inhibitorio permanece incluso después de lavar las esporas para eliminar el tratamiento, lo que confirma la irreversibilidad del mismo y sugiere la posibilidad de utilizar el ácido hexanoico en tratamientos postcosecha.

Aplicación del ácido hexanoico en plantas de tomate

Tratamientos preventivos

Ensayos en plantas de tomate del cultivar Ailsa Craig

Para testar la eficacia del ácido hexanoico contra la infección por *B. cinerea* en plantas de tomate, éste se aplicó mediante spray a distintas concentraciones, en plantas de tomate cv. Ailsa Craig de 4 semanas de desarrollo y 30 minutos después del tratamiento, las plantas fueron inoculadas con esporas de *B. cinerea*. A las 72 h.p.i. se determinó el avance del patógeno en cada caso, midiendo el diámetro del área de necrosis (Figura 44).

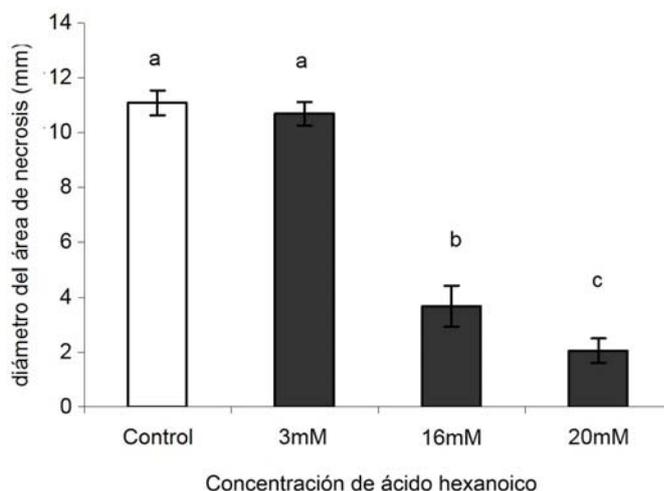


Figura 44. Efecto del tratamiento previo de plantas de tomate con ácido hexanoico sobre la infección con *B. cinerea*. Se trataron plantas de tomate cv. Ailsa Craig de 4 semanas de desarrollo con ácido hexanoico mediante spray. Las plantas fueron inoculadas con esporas de *B. cinerea* 30 minutos después del tratamiento. Las barras indican la media del diámetro de la zona necrosada ($n=10$) tras 72 h.p.i. \pm el error estándar para cada tratamiento. Los grupos de medias estadísticamente diferentes entre sí están indicados con letras ($p<0,05$).

Se comprobó que el tratamiento previo de las plantas de tomate con ácido hexanoico a concentraciones fungicidas (16 y 20 mM) redujo en más del 50% el diámetro de la necrosis producida tras la infección con *B. cinerea*. La aplicación de una concentración inferior a la MCF (3mM) no tuvo efecto sobre la infección, produciéndose una necrosis similar a la de las plantas control, no tratadas. En ningún caso la aplicación del ácido hexanoico produjo signos de fitotoxicidad.

Ensayos en plantas de tomate del cultivar MicroTom

Para comprobar si el tratamiento por spray con ácido hexanoico resultaba efectivo en plantas adultas, se utilizó el cultivar MicroTom. Este cultivar enano de tomate, que fue obtenido con fines ornamentales en jardinería (Scott and Harbaugh 1989), comparte con *Arabidopsis* algunas cualidades que le hacen muy adecuado para el cultivo y la experimentación en el laboratorio (Meissner y col., 1997). Además de su pequeño porte (8-20 cm en altura), crece bien a elevadas densidades de cultivo (hasta 1357 plantas/m²) y posee un ciclo de vida corto (de 70-90 días desde la germinación de las semillas hasta obtener frutos maduros). Por ello, las plantas MicroTom constituyen un buen sistema modelo para estudiar la resistencia frente a patógenos (Yinghui y col., 2005). En nuestro caso, la utilización de este cultivar permitió realizar los tratamietos con ácido hexanoico y estudiar su efecto sobre la infección del hongo, en plantas completamete desarrolladas.

Recientemente se han publicado estudios sobre la interacción con la bacteria patogénica *Ralstonia solanacearum* (Hase y col., 2006; Chen y col., 2006b) y con el hongo biótrofo *Cladosporium fulvum* en este cultivar (Marti y col., 2006) pero no hay antecedentes del fenotipo de MicroTom frente a la infección por *B. cinerea*. Se puso a punto, pues, un protocolo de inoculación con *B. cinerea* y se comprobó que, en nuestras condiciones de ensayo, las primeras lesiones necróticas eran visibles a las 48 h.p.i., pero los síntomas asociados a la infección comenzaban a ser evaluables visualmente 7 días después de la inoculación.

Los tratamientos se llevaron a cabo con plantas que ya habían desarrollado frutos maduros, a las que se aplicó el ácido hexanoico mediante spray a la MCF (16 mM). 30 minutos después del tratamiento se inocularon las esporas de *B. cinerea* y las plantas se mantuvieron en condiciones de elevada humedad relativa, para favorecer la infección. Se monitorizó el avance de la infección y a los 7 días se midió el diámetro de la necrosis producida en las hojas de las plantas (Figura 45).

Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con ácido hexanoico reducía en un 20% la media del diámetro de las necrosis producidas por la infección con *B. cinerea*, confirmando su eficacia fungicida en plantas adultas de tomate.

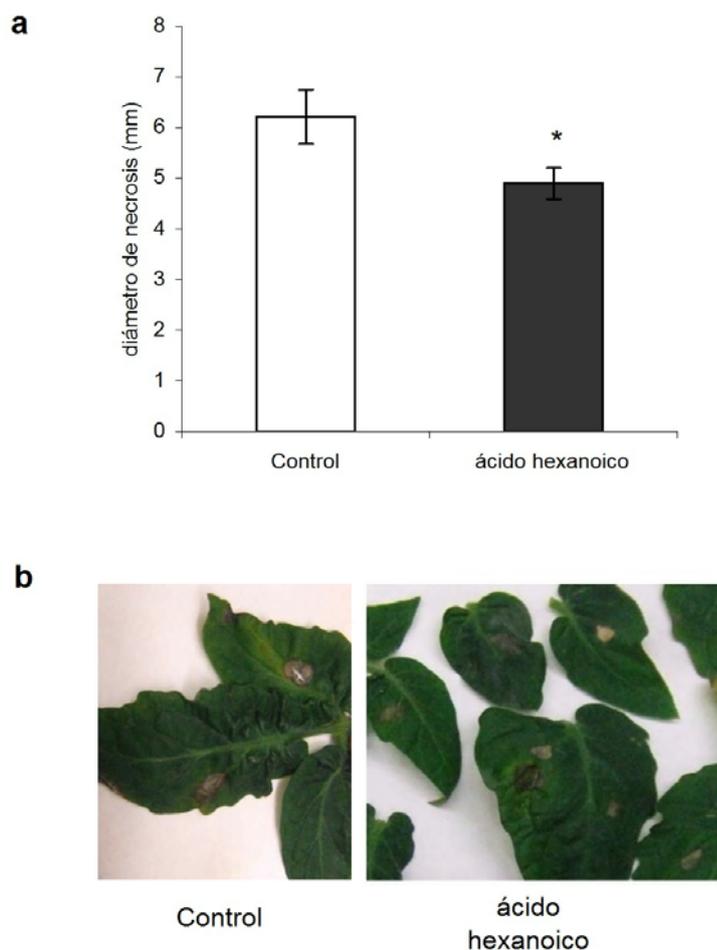


Figura 45. Efecto preventivo del ácido hexanoico sobre plantas adultas de tomate del cultivar MicroTom. Figura 45 a: Se trataron plantas completamente desarrolladas y con frutos maduros de tomate cv. MicroTom con ácido hexanoico 20mM mediante spray. Las plantas fueron inoculadas con esporas de *B. cinerea* 30 minutos después del tratamiento. Las barras indican la media del diámetro de la zona necrosada ($n=30$) tras 7 d.p.i. \pm el error estándar para cada tratamiento. La diferencia estadísticamente significativa respecto de las plantas no tratadas ($p<0,05$) se ha indicado con un asterisco (*). Figura 45 b: Imágenes representativas del área de necrosis 7 d.p.i.

Tratamientos curativos

Ensayos en plantas de tomate del cultivar Ailsa Craig

Teniendo en cuenta que el ácido hexanoico, además de inhibir la germinación de las esporas de *B. cinerea*, tenía capacidad para inhibir el crecimiento del micelio, se analizó la eficacia del tratamiento en plantas inoculadas previamente, en las que la infección estaba ya establecida. Se inocularon plantas de tomate cv. Ailsa Craig de 4 semanas de desarrollo con esporas de *B. cinerea* y 48 h después, se trataron mediante spray con concentraciones fungicidas de ácido hexanoico (Figura 46).

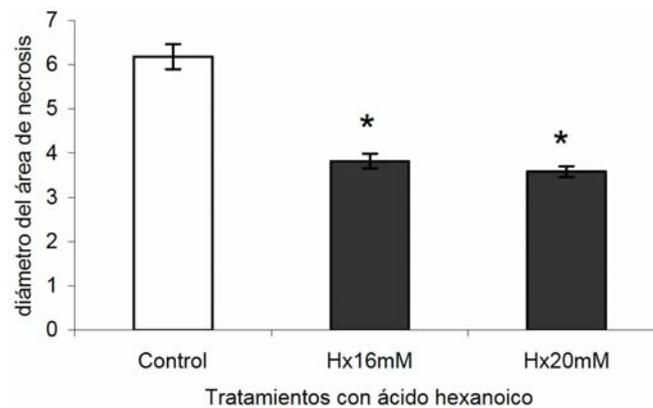


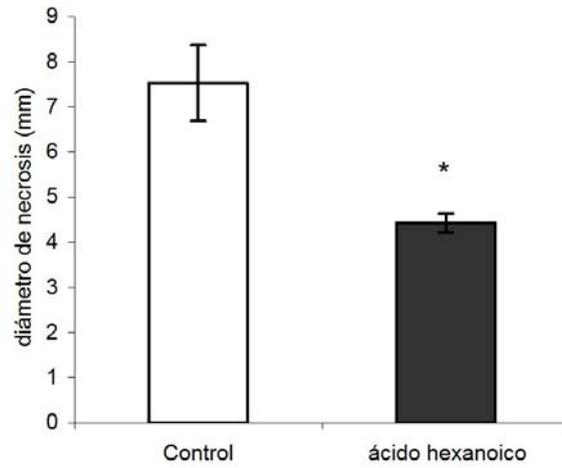
Figura 46. Efecto curativo del ácido hexanoico sobre plantas jóvenes de tomate del cultivar Ailsa Craig. Plantas de tomate cv. Ailsa Craig de 4 semanas de desarrollo se inocularon con esporas de *B. cinerea*. A las 48 h las plantas fueron tratadas con concentraciones fungicidas de ácido hexanoico mediante spray. Las barras indican la media del diámetro de la zona necrosada (n=10) tras 72 h.p.i. ± el error estándar para cada tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas respecto de las plantas no tratadas ($p < 0,05$) se han indicado con un asterisco (*).

Se comprobó que los tratamientos redujeron el diámetro de la necrosis en aproximadamente un 30 %, con respecto a las plantas no tratadas, 24 h después de su aplicación. Estos resultados demuestran que el ácido hexanoico puede frenar el avance de una infección ya establecida en la planta, lo que resulta de gran interés para su posible aplicación como tratamiento con efecto curativo.

Ensayos en plantas adultas del cultivar MicroTom

El efecto curativo del ácido hexanoico también fue comprobado en plantas desarrolladas con fruto del cultivar MicroTom. Para ello, se inocularon las plantas con *B. cinerea* y a las 48h éstas fueron tratadas mediante spray con ácido hexanoico 20mM. Cinco días después del tratamiento se midió el diámetro de la necrosis (Figura 47). El tratamiento con ácido hexanoico resultó aún más eficaz que en el caso de las plantas jóvenes del cultivar Ailsa Craig, observándose una reducción del diámetro del área de necrosis de aproximadamente un 60 % (Figura 47). Los resultados obtenidos demuestran que el ácido hexanoico no sólo previene la infección con *B. cinerea* en plantas adultas, sino que su aplicación reduce el avance de la enfermedad ya establecida en dichas plantas.

a



b

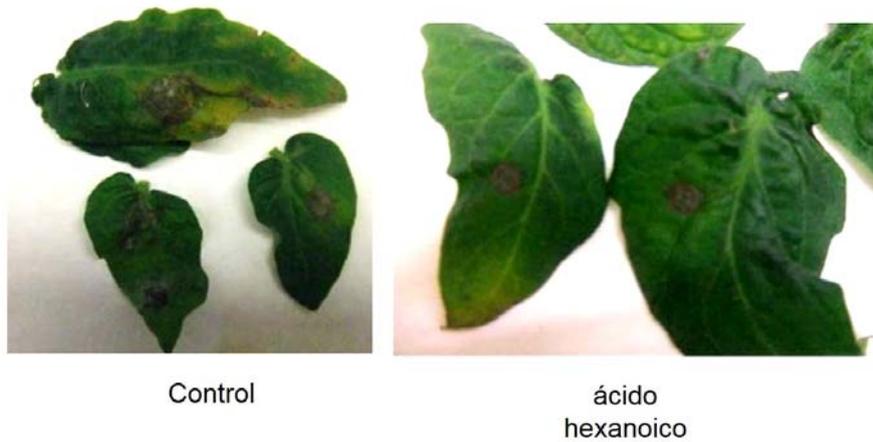


Figura 47. Efecto curativo del ácido hexanoico sobre plantas adultas del cultivar **MicroTom**. Figura 47a: Plantas de tomate desarrolladas y con frutos maduros cv. **MicroTom** se inocularon con esporas de *B. cinerea*. A las 48 h, las plantas fueron tratadas mediante spray con una concentración fungicida de ácido hexanoico. Las barras indican la media del diámetro de la zona necrosada (n=30) tras 7 d.p.i. \pm el error estándar para cada tratamiento. La diferencia estadísticamente significativa respecto de las plantas no tratadas ($p < 0,05$) se indica con un asterisco (*). Figura 47b: Imágenes representativas del área de necrosis observada a los 7 d.p.i., en plantas tratadas y no tratadas.

Aplicación postcosecha del ácido hexanoico

Tratamientos preventivos

Se analizó la eficacia del tratamiento postcosecha con ácido hexanoico sobre frutos de tomate. Para ello, se colectaron frutos de tomate cv. Ailsa Craig en diferentes estados de maduración, que fueron lavados y esterilizados en su superficie mediante baño con lejía diluída al 10%. A continuación, se les practicaron 4 punciones en el pericarpio de la zona ecuatorial y se trataron con ácido hexanoico mediante spray, a una concentración fungicida (20mM). Inmediatamente los frutos fueron inoculados en cada herida con 5 μ L de una suspensión de esporas (4×10^6 esporas/ml). A las 96 h.p.i. se midió el avance de la infección, determinando el diámetro de la necrosis (figura 48).

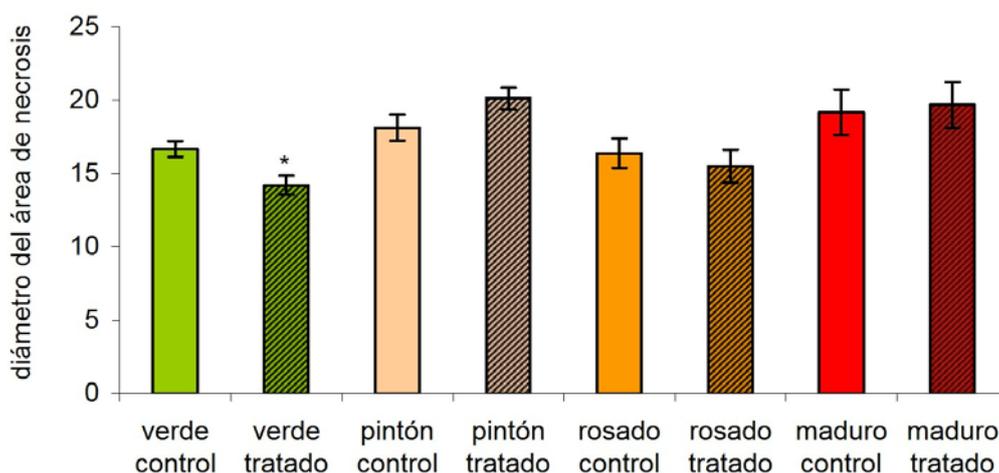


Figura 48. Efecto preventivo del ácido hexanoico como tratamiento postcosecha. Se colectaron frutos de tomate cv. Ailsa Craig en distintos estados de maduración y una vez esterilizados en superficie, se les practicaron 4 incisiones en el pericarpio de la zona ecuatorial. Los frutos fueron rociados mediante spray con ácido hexanoico 20 mM o con agua estéril (control) y posteriormente inoculados con esporas de *B. cinerea*. A las 96 h.p.i. se midió el diámetro de la necrosis. Los experimentos se repitieron 4 veces. Las barras indican la media del diámetro de la zona necrosada ($n=20$) de un experimento representativo \pm el error estándar para cada tratamiento. La diferencia estadísticamente significativa de la media del diámetro del área necrosada respecto de los frutos no tratados ($p<0,05$) se ha indicado con un asterisco (*).

El tratamiento con ácido hexanoico redujo el diámetro del área de necrosis en frutos verdes alrededor de un 14 % (Figura 48) y se comprobó que este efecto era estadísticamente significativo. Este resultado apoya la aplicabilidad postcosecha del ácido hexanoico, puesto que en numerosas ocasiones los frutos son cosechados en estado verde.

Tratamientos curativos

A diferencia de lo que ocurre en la planta, los primeros síntomas de infección en el fruto, que consisten en una necrosis de 1-3 mm de diámetro en el tejido adyacente a la zona de inoculación, se observan a las 24 h post-inoculación. Para observar los efectos del ácido hexanoico sobre una infección ya establecida en el fruto, se infectaron frutos de tomate (cv. Ailsa Craig) cosechados en diferentes estados de maduración y a las 24 h, tras confirmar visualmente los síntomas de la infección, se trataron por spray con ácido hexanoico 20 mM o con agua estéril, en el caso de los frutos control. 72 h después del tratamiento se midió el diámetro del área necrosada (Figura 49).

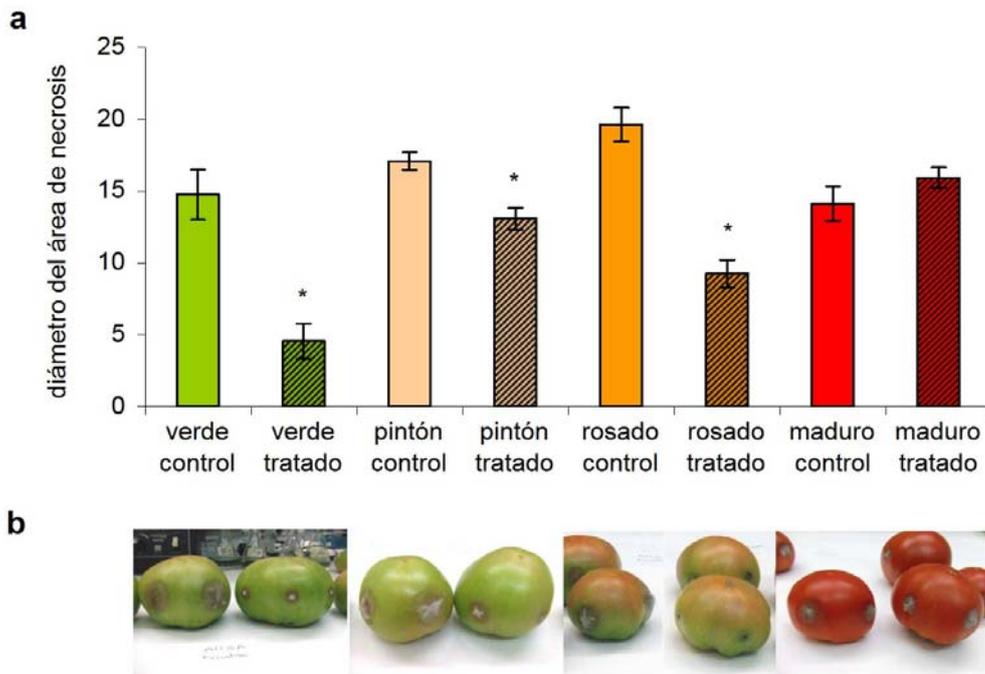


Figura 49. Efecto curativo del ácido hexanoico como tratamiento postcosecha. (Figura 49a): Se colectaron frutos de tomate (cv. Ailsa Craig) en distintos estados de maduración y una vez esterilizados en superficie, se les practicaron 4 incisiones en el pericarpio de la zona ecuatorial. Los frutos fueron inoculados con esporas de *Botrytis cinerea*. A las 24 h.p.i., una vez confirmado el establecimiento de la infección visualmente, los frutos fueron rociados mediante spray con ácido hexanoico 20 mM o con agua estéril (control). A las 96 h.p.i. se midió el diámetro de la necrosis. Los experimentos se repitieron 4 veces. Las barras indican la media del diámetro de la zona necrosada (n=20) de un experimento representativo \pm el error estándar para cada tratamiento. La diferencia estadísticamente significativa de la media del diámetro del área necrosada respecto de los frutos no tratados ($p < 0,05$) se ha indicado con un asterisco (*). **Figura 49b:** Imágenes representativas del área de necrosis 96 h.p.i.

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con ácido hexanoico reduce significativamente el avance de la infección en frutos previamente infectados, excepto en el estado maduro. El efecto más pronunciado se obtuvo en los frutos verdes, en los que el diámetro del área necrosada disminuyó alrededor de un 60 % y en los frutos en el estado de maduración denominado rosado (entre un 30 % y un 60 % de la superficie del fruto tiene color rosado) en que el diámetro de la necrosis se redujo en aproximadamente un 50 % (Figura 49). En la figura 49b se pueden observar fotografías de frutos representativos de los experimentos realizados, que ilustran el efecto curativo del ácido hexanoico.

Los resultados obtenidos en las aplicaciones pre y postcosecha del ácido hexanoico señalan al ácido hexanoico como un buen candidato para el diseño y desarrollo de tratamientos, tanto durante el crecimiento de las plantas y el desarrollo de los frutos, como tras su recolección y almacenamiento postcosecha.

DISCUSIÓN

Caracterización del efecto fungicida del AAME

En este capítulo se ha demostrado que el monoéster etílico del ácido adípico (AAME) inhibe el crecimiento de *Botrytis cinerea*, tanto *in vitro* como sobre un soporte biológico. El AAME inhibe completamente la germinación de las esporas de *B. cinerea*, que consta de varias etapas. La primera supone el establecimiento de fuerzas de adhesión, que unen las esporas a un soporte. Le sigue una etapa de hidratación, previa a la formación del tubo germinativo. Finalmente, tras la germinación, las esporas de *B. cinerea* se unen fuertemente mediante la secreción de una matriz extracelular (Doss y col., 1993; Doss y col., 2003). Los resultados obtenidos demuestran que, a concentraciones inferiores a la mínima concentración fungicida (MCF), las esporas no habían germinado a las 24 h, pero al microscopio se observaban hinchadas, indicando que la etapa de hidratación había tenido lugar. Este hecho se correlacionaba con los resultados obtenidos tras 7 días de incubación, en los que se observaba que a esas concentraciones de AAME la germinación finalmente había tenido lugar, por lo que se había producido un retraso en la germinación, pero no su completa inhibición. A concentraciones de AAME iguales o superiores a la MCF, las esporas no germinaron tras 24 h, ni tampoco a los 7 días. Se comprobó, asimismo, que tras un tratamiento con AAME a la MCF de tan sólo 2 h, las esporas de *B. cinerea* no recuperaron la capacidad de germinar tras la eliminación de dicho tratamiento, lo que demostró la irreversibilidad de su acción fungicida. La capacidad inhibitoria sobre la germinación es una cualidad muy valorada en los tratamientos fungicidas, puesto que para lograr una efectiva protección de los frutos contra los patógenos de postcosecha, es conveniente actuar en las etapas más tempranas de la infección del fruto (Bryk y col., 1998).

El AAME no sólo inhibe la germinación de las esporas, sino que también inhibe el crecimiento del micelio. Esta característica resulta de gran interés, ya que otros compuestos utilizados actualmente, como los pertenecientes a la clase de las estrobilurinas, que bloquean la cadena de transporte de electrones mitocondrial a nivel del complejo citocromo *bc1*, inhiben la germinación de las esporas, pero son mucho menos activos como inhibidores del crecimiento del micelio (Sauter y col., 1999). También, el estudio reciente de un compuesto fungicida, perteneciente a la clase de las antraquinonas, concluyó que el 4,4,-dimetilantraceno-1,9,10(4H)-triona era muy activo sobre la germinación, inhibiéndola totalmente a las 7 h de tratamiento, pero resultaba menos activo como inhibidor del crecimiento del micelio (Mendoza y col., 2005). Por otra parte, muchos fungicidas inhiben eficazmente el

desarrollo del micelio, pero tienen escaso o nulo efecto sobre la germinación de las esporas, como ocurre con los inhibidores de la síntesis de ergosterol (Buchenauer, 1978) y con los bencimidazoles, como la carbendazima o los N-fenil carbamatos, que son inhibidores de la formación de los microtúbulos, e inhiben la división nuclear (Suzuki y col., 1984).

El efecto antifúngico mostrado por el AAME es por tanto inusual, tan sólo observado en fungicidas tales como los fenilpirroles y las hidroxianilidas, como la fenhexamida (Rosslenbroich & Stuebler, 2000). Un objetivo importante en la investigación actual, para lograr el control efectivo de las enfermedades de las plantas, es la búsqueda de agentes antifúngicos con nuevos modos de acción. Como se ha indicado anteriormente, el AAME es un derivado del ácido adípico, uno de los ácidos orgánicos cuyo uso como conservante alimentario está permitido (Freese y col., 1973). El efecto de estos ácidos, como es el caso del ácido sórbico, puede ser atribuido, en parte, a una acidificación del citoplasma, que activaría los mecanismos de homeóstasis de la célula, reduciendo así la energía disponible para las funciones metabólicas esenciales y, por tanto, el crecimiento (Pearce y col., 2001). Los experimentos llevados a cabo para estudiar el modo de acción del AAME revelaron la dependencia del pH en la efectividad del mismo, a concentraciones menores que la MCF. Este efecto no se observó a concentraciones próximas a la MCI y a la MCF, sugiriendo un mecanismo más complejo que la acidificación citoplasmática. Los ensayos realizados demuestran que el AAME no ejerce una actividad lítica sobre la membrana de *B. cinerea*. Sin embargo, el tratamiento con AAME provocó la salida de iones fosfato al medio extracelular, sugiriendo una alteración de la permeabilidad de las membranas del hongo. Este efecto se ha observado también al estudiar el mecanismo de acción de una antraquinona (Mendoza y col., 2005) y de varios diterpenoides con actividad contra *B. cinerea* (Cotoras y col., 2004), así como de una serie de compuestos alifáticos (2E)-alquenos de entre 5 y 14 átomos de carbono, caracterizados como agentes antimicrobianos (Kubo y col., 1995).

Será necesario estudiar la especificidad del efecto del AAME, así como su acción sobre la membrana, puesto que no se puede descartar que los cambios observados en la permeabilidad de la membrana puedan ser debidos a otros efectos producidos sobre el metabolismo de *B. cinerea*.

Finalmente, se ha demostrado que el tratamiento de las esporas durante 2 h con AAME, a la MCF, suprime la capacidad de *B. cinerea* para causar la podredumbre gris en frutos de tomate inoculados en condiciones controladas, incluso después de eliminar el tratamiento mediante repetidos lavados. Esto confirma la irreversibilidad del tratamiento.

Los resultados obtenidos evidencian la eficacia del AAME sobre un huésped y apoyan su uso potencial como tratamiento fungicida alternativo a los actuales.

Efecto protector del ácido hexanoico. Caracterización de su actividad inductora

Se ha demostrado que el ácido hexanoico protege a las plantas de tomate frente al ataque por *B. cinerea*, estimulando sus mecanismos de defensa. La resistencia inducida por el ácido hexanoico parece estar basada en la estimulación de la acumulación de calosa alrededor de la zona de penetración del patógeno. Se ha comprobado que las plantas de tomate cv. Ailsa Craig no acumulan calosa en respuesta a la infección, pero el tratamiento previo de las mismas con ácido hexanoico indujo una gran acumulación de dicho polisacárido alrededor del área de infección. Este resultado demuestra que los mecanismos subyacentes en la resistencia inducida no siempre coinciden con los de la respuesta basal de la planta frente al patógeno. Otro dato interesante, que deriva del primer capítulo de la presente tesis, es que las plantas de tomate del cultivar T5 sí acumulaban calosa como respuesta basal al ataque por *B. cinerea*, a diferencia del cultivar Ailsa Craig, lo que indica que la participación de la calosa en la respuesta basal de *Solanum lycopersicum* frente a *B. cinerea* puede depender del cultivar.

En *Arabidopsis* se ha demostrado que la estimulación de la acumulación de calosa constituye un mecanismo efectivo de resistencia inducida frente a patógenos necrótrofos (Zimmerli y col., 2000; Ton y col., 2005). También se ha comprobado en estas plantas que el efecto inductor del BABA se basa en la deposición temprana e incrementada de este polisacárido (Ton&Mauch-Mani, 2004). Por ello, para determinar la eficacia del tratamiento por vía radicular con ácido hexanoico, se aplicó BABA en las mismas condiciones y se comprobó que el nivel de protección ejercido por ambos compuestos era similar. Asimismo, se demostró que las plantas de tomate tratadas con BABA acumulaban calosa en respuesta a *B. cinerea*.

Las plantas de tomate también se trataron con SA aunque, en estas condiciones experimentales, la protección observada fue inferior a la lograda por el ácido hexanoico. En este caso se comprobó que el tratamiento no producía una inducción significativa de la acumulación de calosa en respuesta al patógeno, siendo este resultado consistente con las conclusiones obtenidas en *Arabidopsis*, que postulan que la ruta del SA antagoniza con la síntesis de calosa (Nishimura *et al.*, 2003; Ton&Mauch-Mani, 2004).

Por otra parte, el tratamiento con ácido hexanoico, al igual que ocurrió con el BABA, no produjo por sí sólo acumulación de calosa en las plantas sin infectar. Por tanto, el efecto inducido por el ácido hexanoico sólo se manifiesta cuando se produce la interacción con el patógeno. Este tipo de efecto es considerado como de cebado o *priming* (Conrath y col., 2006). Desde el punto de vista de una posible utilización como tratamiento inductor, presenta la ventaja de no alterar significativamente el metabolismo de la planta hasta que no se enfrenta a un estrés biótico.

El tratamiento local de las plantas con el inhibidor de la síntesis de calosa 2 desoxi-D-glucosa (DDG), redujo significativamente la acumulación de calosa inducida por el tratamiento con ácido hexanoico, lo que se correlacionó con una mayor susceptibilidad a *B. cinerea*. Por tanto, la deposición de calosa constituye uno de los mecanismos implicados en la actividad inductora del ácido hexanoico. El hecho de que el tratamiento con DDG no inhibiera por completo la deposición de calosa inducida por el ácido hexanoico se corresponde con lo observado previamente en *Arabidopsis*, ya que el tratamiento simultáneo de hojas cortadas con BABA y DDG produjo una inhibición parcial de la deposición de calosa, que se pudo correlacionar igualmente con una pérdida de la protección inducida por el BABA frente a *A. brassicicola* (Ton & Mauch-Mani, 2004)

El análisis de genes marcadores de dos de las rutas principales de señalización hormonal en la respuesta a patógenos, reveló que el ácido hexanoico no estimulaba significativamente la acumulación del transcrito de *PR1*, un gen marcador de la ruta dependiente del SA, con respecto a las plantas no tratadas, tras la infección con *B. cinerea*. Este transcrito se acumuló en respuesta al tratamiento con SA, lo cual era indicativo de que éste resultaba efectivo en las condiciones experimentales utilizadas. En cuanto al tratamiento con BABA, otros autores habían comprobado que en *Arabidopsis* se inducía la expresión de *PR1* en la interacción con *B. cinerea* (Zimmerli y col., 2000) y más recientemente, frente a otros dos necrótrofos (Ton & Mauch-Mani, 2004). En tomate no había referencias previas a su regulación tras el tratamiento frente a un patógeno necrótrofo. En nuestras condiciones experimentales, el BABA produjo una mayor acumulación de *PR1* en las plantas inoculadas con *B. cinerea* que en las plantas no tratadas.

El gen *Loxd* codifica una lipooxigenasa implicada en la síntesis del JA. La actividad enzimática de *Loxd* se incrementa como parte del mecanismo de la resistencia sistémica inducida (ISR) que confiere la bacteria no patogénica *Pseudomonas putida* BTP1 a las plantas de judía, frente a la infección por *B. cinerea* (Ongena y col., 2004). A diferencia del SA y del BABA, el ácido hexanoico incrementó significativamente la expresión de *LoxD* en respuesta a *B. cinerea*. Estos resultados

indicaban que los mecanismos en los que se basa la resistencia inducida por el BABA y el ácido hexanoico eran diferentes, sugiriendo la posible conexión del efecto inductor del ácido hexanoico con la ruta mediada por el JA.

Para confirmar esta hipótesis se utilizó el mutante *def1* (*defenseless-1*), deficiente en la acumulación de JA (Howe y col., 1996), ya que presenta una mutación que bloquea la ruta de síntesis del JA (Li y col., 2002), pero que recupera el fenotipo normal tras el tratamiento con JA. Las plantas *def1* respondieron al tratamiento con ácido hexanoico, aunque la protección inducida frente a *B. cinerea* resultó menos efectiva que en las plantas silvestres. Este resultado sugiere que la ruta mediada por JA no es esencial para la actividad inductora del ácido hexanoico.

Sin embargo, es necesario tener en cuenta la mayor resistencia mostrada por el mutante frente a *B. cinerea* y explicar porqué el tratamiento con ácido hexanoico no resultó tan efectivo como en el genotipo silvestre, que no acumula calosa como mecanismo basal de respuesta frente a este patógeno. Por lo tanto, se requerirán estudios adicionales para determinar exactamente la implicación de la ruta del JA en la actividad inductora del ácido hexanoico.

Aunque existe una amplia información acerca del papel del JA y de la ruta de las oxilipinas en las respuestas frente a patógenos (Glazebrook, 2005; Shah, 2005; Jones & Dangl, 2006; Vellosillo y col., 2007), todavía no se ha establecido el papel que desempeñan en la defensa del tomate frente a *B. cinerea*. Por una parte, Audenaert y colaboradores (2002b) observaron que el tratamiento con JA no protegía a las plantas de tomate contra *B. cinerea* y que el mutante *def1* mostraba el mismo fenotipo de infección que las plantas control (cv. Castlemart). Sin embargo, Díaz y colaboradores (2002) observaron una mayor susceptibilidad de *def1* frente a *B. cinerea*, concluyendo que el JA estaba implicado en la resistencia del tomate frente a este patógeno. Los autores justificaron las aparentes discrepancias con los resultados de Audenaert y colaboradores, en que dichos autores trabajaban con hojas previamente cortadas de plantas de 5 semanas de desarrollo, mientras que ellos realizaban las infecciones en plantas enteras de 3 semanas de desarrollo de otro cultivar de tomate (cv. Moneymaker).

En nuestro caso los estudios se han realizado en plantas enteras de 4 semanas de desarrollo (cv. Ailsa Craig) y en las condiciones experimentales utilizadas, las plantas *def1* sin tratar resultaron más resistentes a *B. cinerea* que las plantas control. Al comparar los resultados obtenidos con los de Díaz y colaboradores (2002) cabe pensar que, dependiendo de la forma de evaluar los síntomas de infección, los resultados pueden llevar a conclusiones diferentes. Dichos autores encontraron que el porcentaje de lesiones en expansión en las plantas *def1* era mayor que en las plantas control. Sin embargo, atendiendo a la tasa diaria de

expansión de la necrosis, no se apreciaban diferencias entre ambos tipos de plantas.

Hay autores que destacan la importancia de las cepas patógenas utilizadas y de los métodos experimentales utilizados, en los resultados obtenidos (Thaler y col., 2004). Asimismo, se ha comprobado que la susceptibilidad de *Arabidopsis thaliana* frente a distintos patógenos, a menudo es opuesta a la mostrada por *Solanum lycopersicum* (Thaler y col., 2004). De hecho, existen evidencias de que en *Arabidopsis* las respuestas dependientes de JA protegen contra necrótrofos (Penninckx y col., 1996; Staswick y col., 1998; Vijayan y col., 1998; Norman-Setterblad y col., 2000), incluido *B. cinerea* (Thomma y col., 1998), pero no contra la mayoría de patógenos biótrofos (Reuber y col., 1998; Thomma y col., 1999a) y hemibiótrofos (Roetschi y col., 2001). En tomate, sin embargo, se ha comprobado que el mutante *def1* es más susceptible a patógenos biótrofos y hemibiótrofos (Thaler y col., 2004).

Podemos pues concluir que el ácido hexanoico estimula la expresión de genes marcadores de la ruta dependiente de JA, aunque dicha señalización no parece imprescindible para la resistencia inducida por él.

En este capítulo se ha determinado la posible implicación del ácido abscísico (ABA) en la actividad inductora del ácido hexanoico, ya que las plantas del mutante de tomate *flacca (flc)*, que es deficiente en la síntesis de ABA, resultaron insensibles al tratamiento con hexanoico.

En los últimos años se han aportado múltiples evidencias que apoyan la implicación del ABA en la interacción planta-patógeno (Audenaert y col., 2002b; Anderson y col., 2004; Thaler & Bostock, 2004; Thaler y col., 2004; Ton & Mauch-Mani, 2004; Ton y col., 2005). En muchos casos se ha considerado que esta hormona actúa como un regulador negativo de la resistencia a patógenos, interfiriendo con las rutas de señalización dependientes de otras hormonas, (Audenaert y col., 2002b; Mohr & Cahill, 2003; Anderson y col., 2004; Thaler & Bostock, 2004). Hay estudios que han demostrado que en *Arabidopsis* la aplicación exógena de ABA induce susceptibilidad a *Pseudomonas syringae* pero no afecta a la resistencia contra *Hyalospora parasitica*. En contraste, el mutante de *Arabidopsis* deficiente en ABA *aba-1*, muestra menor susceptibilidad a *Hyalospora parasitica* (antes *Peronospora parasitica*) mientras que el mutante insensible a ABA *abi1-1* no mostraba mayor resistencia (Mohr & Cahill, 2003). Sin embargo, recientemente se ha comprobado que en *Arabidopsis*, el ABA puede actuar como un regulador positivo de la resistencia de la planta, potenciando la acumulación de calosa (Ton y Mauch Mani, 2004; Ton y col., 2005; Flors y col., 2008).

En tomate otros autores habían observado un incremento en los niveles de ABA tras la infección con *B. cinerea* y un aumento de la susceptibilidad a este patógeno tras su aplicación exógena (Kettner y Dörffling, 1995). Posteriormente se ha comprobado que el ABA podría constituir un factor de susceptibilidad en tomate utilizando el mutante *sitiens*. Estas plantas, que contienen el 8% del ABA presente en las plantas control y son incapaces de inducir la acumulación de ABA, eran más resistentes frente a *B. cinerea* (Audenaert, 2002b).

Por otra parte, *flacca* (*flc*) es un mutante de tomate que tiene bloqueadas dos actividades enzimáticas que actúan en los últimos pasos de la biosíntesis del ABA y que requieren un cofactor de molibdeno (MoCo); La aldehído oxidasa (en la que también son deficientes las plantas *sitiens*) y la xantina deshidrogenasa (Marin y MarionPoll, 1997). A diferencia de las plantas *sitiens*, las plantas *flacca* conservan un nivel de ABA residual del 21%, comparado con las plantas control (Herde y col., 1999). Consistentemente con las observaciones de Audenaert y de otros trabajos más recientes, en los que también infectaban plantas *sitiens* con *B. cinerea* y con el hongo biótrofo *Oidium neolycopersici* (Achuo y col., 2006), el mutante *flacca* resultó ser más resistente a la infección por *B. cinerea*.

También el efecto antagónico del ABA y el SA se ha mostrado en numerosos estudios (Chini y col., 2004; Kim y col., 2004; Xiong & Yang, 2003; Mohr & Cahill, 2003; Mohr & Cahill, 2007). De hecho, se ha visto que los efectores bacterianos tipo III de secreción actúan manipulando la biosíntesis y señalización del ABA, como una estrategia de virulencia para suprimir las respuestas defensivas de la planta (de Torres-Zabala y col., 2007). Por otra parte, el ABA puede mimetizar la resistencia a patógenos necrótrofos inducida por BABA, que activa la deposición de calosa y la señalización dependiente de JA y ET (Thomma y col., 1998; Ton & Mauch-Mani, 2004). Estas observaciones se ven reforzadas por el hecho de que el ABA puede reprimir la señalización dependiente de SA, que a su vez reprime tanto la señalización dependiente de JA y ET, como la deposición de calosa (Jacobs y col., 2003; Nishimura y col., 2003). Si el ácido hexanoico actuase estimulando la síntesis, acumulación o una señalización dependiente de ABA, se podría producir una represión de la ruta dependiente de SA y una inducción de la ruta dependiente de JA, lo cual sería consistente con los resultados obtenidos en los análisis de expresión de genes, puesto que el ácido hexanoico indujo *Loxd* y no *PR1*.

Además, recientemente se han aportado evidencias de que el ABA puede jugar un papel regulador de la acumulación de calosa en *Arabidopsis thaliana* (Nishimura y col., 2003; Ton y Mauch-Mani, 2004; Ton y col., 2005). El ABA no parece regular directamente la deposición de calosa en *Arabidopsis*, sino más bien la capacidad de acumular el polímero de forma más intensa y rápida. De hecho, el mutante *ibs3*,

deficiente en la regulación de un gen implicado en la biosíntesis de ABA, no es deficiente en la acumulación de calosa en respuesta a patógenos, si no que tiene bloqueada la capacidad de experimentar el *priming* producido por el BABA. El tratamiento con ácido hexanoico no confirió resistencia a las plantas *flacca*, apoyando que el ácido abscísico podría jugar un papel en la inducción de resistencia mediada por el ácido hexanoico. Similarmente a las observaciones de Ton y colaboradores (2005), el mutante *flacca* podría haber perdido la capacidad de experimentar el *priming* inducido por el ácido hexanoico.

No obstante, a partir de los resultados obtenidos no se puede concluir un papel decisivo del ABA en la resistencia inducida por el ácido hexanoico, debido a que el mutante *flacca* es más resistente *per se* a la infección por *B. cinerea*. Este hecho podría explicarse por varias hipótesis.

En primer lugar, se ha visto que la influencia del ABA en las infecciones virales es probablemente debida al hecho de que el ABA puede regular negativamente la expresión del gen de la β -1,3-glucanasa encargada de degradar la calosa y consecuentemente, reducir su actividad (Rezzonico y col., 1998). Por tanto, la inhibición de los enzimas degradativos de la calosa podría ser otra vía de incrementar la deposición de calosa por acción del ABA e inducir así la resistencia a patógenos. Para confirmar esta hipótesis se requeriría un estudio futuro de dichos enzimas.

También se ha especulado con que el ABA controle la deposición de calosa mediante regulación transcripcional de receptores SNARE, que median el transporte en vesículas y la liberación de compuestos tóxicos y de calosa sintasa en los puntos de penetración de hongos patógenos (Leyman y col., 1999; Collins y col., 2003; Flors y col., 2005).

Además, se sabe que el ABA influye en la composición de la pared celular de varias maneras (Lohani y col., 2004), incluyendo la alteración de la matriz de pectina (Micheli, 2001). Además, se ha encontrado una conexión entre la composición de la pared celular y la regulación del ABA (Chen y col., 2005; Hernandez-Blanco y col., 2007). La disrupción del gen de la celulosa sintasa implicada en la formación de la pared secundaria, *CESA8/IRX1*, provoca una mayor acumulación de ABA en *Arabidopsis* (Chen y col., 2005) y dos mutantes deficientes en *CESA8* ("*irregular xilem*", *irx1-6*) y en *CESA4* (*irx5-5*) muestran inducción constitutiva de numerosos genes regulados por ABA (Hernández-Blanco y col., 2007).

Teniendo todos estos datos en cuenta, es evidente que el ABA puede jugar un papel regulador de la respuesta a patógenos a varios niveles y dentro de ellos, puede regular la deposición de calosa por varias vías distintas. La falta de respuesta

al ácido hexanoico del mutante *flacca* podría deberse a alteraciones en la deposición de calosa en este mutante o a otros procesos dependientes de ABA. Alternativamente, el mutante *flacca* podría ser más resistente a *B. cinerea* porque tenga inducida la deposición de calosa, no siendo acumulable el efecto del ácido hexanoico. Estas cuestiones tendrán que ser clarificadas en estudios futuros para determinar si el ABA es una hormona clave en la resistencia inducida por el ácido hexanoico.

Actividad antifúngica del ácido hexanoico

El ácido hexanoico puede desempeñar diferentes funciones en la interacción planta-patógeno ya que, además de la actividad inductora de las defensas de las plantas, discutida anteriormente, se ha demostrado que es capaz de inhibir el crecimiento de *B. cinerea*, tanto *in vitro* como *in vivo*, a concentraciones no fitotóxicas. Este doble efecto no es habitual entre los inductores conocidos, como por ejemplo el BABA, aunque recientemente se ha descrito que las oxilipinas también son capaces de actuar tanto sobre la planta, como sobre los patógenos (Prost y col., 2005). Se ha visto también que algunos fungicidas del grupo de las estrobilurinas, especialmente la piraclostrobina (comercializado como BAS 500F), afectan al metabolismo de las plantas, además de producir un efecto tóxico sobre los patógenos (Herms y col., 2002). Este doble efecto puede ser muy ventajoso, ya que existen varios trabajos que demuestran que los inductores son más eficaces en combinación con fungicidas, como en el caso del BTH con estrobilurinas, triazoles, ditiocarbamatos y otros (Leskovar & Kolenda, 2002; Ryley y col., 2003; Gent & Schwartz, 2005) y del BABA con triazoles (Cohen, 1998).

En este trabajo se ha demostrado que el ácido hexanoico inhibe completamente la germinación de las esporas de *B. cinerea*, lo que podría explicar la reducción del área de necrosis en plantas o frutos tratados previamente a la infección. Los estudios realizados *in vitro* demostraron que a concentraciones inferiores a la MCF las esporas no habían germinado a las 24 h, pero al microscopio se observaban hinchadas, indicando que la etapa de hidratación había tenido lugar. En estas condiciones, tras 7 días de incubación, las esporas germinaron, por lo que en realidad sólo se producía un retraso en dicho proceso. Se comprobó también la irreversibilidad de su efecto a la MCF. A concentraciones iguales o superiores a la MCF de ácido hexanoico, las esporas no se observaban hinchadas sino que, por el contrario, se observó una retracción del citoplasma, con presencia de granulaciones. Estos efectos se han observado también tras el tratamiento con resveratrol, un compuesto natural con propiedades antifúngicas presente en la uva

(Sbaghi y col, 1995). En algunos hongos biótrofos formadores de micorrizas este efecto en las hifas de las esporas germinadas constituye una estrategia, que permite alargar la viabilidad y la capacidad de infectar al huésped, durante condiciones de crecimiento desfavorables (Logi y col., 1998). Sin embargo, en estudios muy recientes, en los que se caracterizaba el efecto fungicida de compuestos volátiles generados por *Bacillus subtilis*, se observó que una vez producida la retracción del citoplasma en las esporas de *B. cinerea*, éstas no podían germinar, incluso después de transferirlas a medio PDA fresco. Esto sugirió que la retracción del citoplasma en *B. cinerea* podía ser letal, en lugar de una estrategia de supervivencia (Chen y col., 2008). Estos autores encontraron además, que entre los componentes volátiles con efecto fungicida estaba, por ejemplo, el acetaldehído, para el que recientemente se había descrito un efecto antifúngico sobre *B. cinerea* y sobre otros patógenos (Almenar y col., 2007) y el 2-etil-hexanol, para el que se había descrito su efecto sobre otros patógenos (Fernando y col., 2005).

La actividad del ácido hexanoico como antifúngico, al igual que ocurre con el AAME, no sólo está asociada con su capacidad para inhibir la germinación, sino también con su habilidad para inhibir el crecimiento del micelio. Su eficacia como tratamiento curativo, una vez establecida la infección, podría deberse a esta actividad sobre el micelio. El efecto sobre la germinación y el desarrollo del micelio sólo se ha observado en fungicidas tales como los fenilpirroles y las hidroxianilidas, como la fenhexamida (Rosslenbroich & Stuebler, 2000). Los tratamientos comerciales utilizados en este capítulo, incluyendo el benomilo, que estaba indicado especialmente para el control preventivo y curativo de *B. cinerea* antes de su prohibición, no presentaron este doble efecto en las condiciones experimentales utilizadas. De hecho, este compuesto sólo inhibió la germinación de las esporas, siendo esto consistente con observaciones previas que indicaban que detenía la elongación del tubo germinativo (Leroux y col., 1998). Los bencimidazoles, como la carbendacima, que inhiben la formación de los microtúbulos o los N-fenil carbamatos, que inhiben la división nuclear, detienen el crecimiento del micelio, pero tienen escaso o ningún efecto sobre la germinación de las esporas (Suzuki y col., 1984). Por tanto, los estudios realizados *in vitro* sugieren que tanto el ácido hexanoico, como el AAME, pueden ser eficaces en el control de *B. cinerea*, presentando algunas ventajas con respecto a los fungicidas comerciales.

Con respecto a la caracterización del posible modo de acción del ácido hexanoico se analizó el efecto del pH sobre su actividad fungicida. Aunque los porcentajes de germinación observados a diferentes pHs no mostraron diferencias significativas, se comprobó mediante análisis microscópico, que a concentraciones parcialmente efectivas, el retraso en el desarrollo de las esporas era más acusado a pHs

inferiores al pKa, aunque finalmente germinaban. Sin embargo, no se observaban diferencias a concentraciones inhibitorias o fungicidas. Estos resultados sugerían un modo de acción más complejo que la simple acidificación del citoplasma, propuesta previamente para otros ácidos carboxílicos con actividad fungicida (Stratford & Anslow, 1998). De hecho, estudios realizados *in vitro* demostraron que tanto las formas disociadas como las no disociadas del ácido sórbico, un compuesto autorizado como conservante alimentario, contribuían a inhibir el crecimiento de diversos hongos como *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Ulocladium atrum* (Skirdal & Eklund, 1993). Asimismo, se demostró, que este ácido inhibía el crecimiento de la levadura por un mecanismo relacionado con la falta de disponibilidad de energía y no con la simple alteración del pH intracelular (Bracey y col., 1998; Pearce y col., 2001). De hecho, se había demostrado que este compuesto alteraba el gradiente de protones de la membrana celular y mitocondrial y que provocaba la desorganización de las membranas mitocondriales (Eklund, 1985; Kinderlerer & Hatton, 1990). Estas observaciones podrían estar relacionadas con las granulaciones observadas en las esporas de *B. cinerea* tratadas con ácido hexanoico.

El análisis del efecto del ácido hexanoico sobre las membranas de *B. cinerea* demostró que éste no ejerce una actividad lítica, pero sí provocó un aumento de la concentración de los iones fosfato en el medio extracelular, sugiriendo la alteración de la permeabilidad de la membrana. Como se ha mencionado anteriormente, este efecto también lo producen otros compuestos (Mendoza y col., 2005; Cotoras y col., 2004; Kubo y col., 1995). En el caso de una serie de compuestos alifáticos (2E)-alquenes de 5 a 14 átomos de carbono, se ha establecido una relación entre su estructura química y su actividad antimicrobiana. Se ha demostrado que se obtiene la máxima eficacia cuando en la estructura se halla una proporción apropiada de parte hidrofílica e hidrofóbica. Se ha sugerido como mecanismo de acción que la cabeza hidrofílica se uniría como un gancho a la parte hidrofílica de la membrana, mediante puentes de hidrógeno intermoleculares y que la cola hidrofóbica de la molécula se internaría en la bicapa lipídica de la membrana, lo que provocaría un desorden en la bicapa fluida de la misma (Nihei y col., 2003). En cualquier caso, será necesario establecer la especificidad del efecto del ácido hexanoico sobre la membrana, para descartar otros efectos sobre el metabolismo de *B. cinerea*.

Por otra parte, como se ha descrito en la introducción, entre los compuestos que presentan un doble efecto fungicida e inductor se incluyen varios volátiles emitidos por las plantas. Las plantas generan una compleja mezcla de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) tras el ataque por insectos herbívoros y por patógenos (Matsui,

2006) para repelerlos o incluso para atraer predadores naturales de los herbívoros atacantes (Dudareva & Negre, 2005). Recientemente se ha demostrado que las señales volátiles pueden inducir un efecto de cebado o *priming* y una resistencia indirecta en maíz (Ton y col., 2007). Varios volátiles emitidos por *Solanum lycopersicum*, como el (E)-2-hexenal, pueden inhibir a *B. cinerea*, siendo éste el más efectivo (He y col., 2006; Zhang y col., 2008). Los estudios más recientes han determinado que la composición de volátiles emitidos por hojas de tomate varía con el desarrollo (Zhang y col., 2008). El (E)-2-Hexenal constituye el componente principal de los VOCs emitidos por las hojas de tomate y su contenido se incrementa con el desarrollo de las mismas, lo que se correlaciona con la tasa de inhibición de *B. cinerea*. Los VOCs emitidos por *Solanum lycopersicum* inhibían tanto la germinación de las esporas de *B. cinerea* como el desarrollo del micelio. Además, se ha visto que el (E)-2-hexenal podría funcionar como un elicitor volátil de la respuesta defensiva en plantas de algodón (Zeringue, 1992). Más recientemente se ha comprobado que este compuesto puede activar las defensas de las plantas (Farmer, 2001). Por otra parte, se ha visto que varios elicitors producen cambios en la composición de los volátiles que emiten las plantas, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo (Obara y col., 2002). Existen estudios recientes que demuestran que algunos MAMPs podrían estimular la emisión de volátiles para aumentar la resistencia de la planta e incrementar el efecto inhibitorio sobre *B. cinerea* (Paré y col., 2005; He y col., 2006). Es tentador pensar en otros posibles mecanismos de acción del ácido hexanoico como inductor de la resistencia, relacionados con una mayor producción de compuestos volátiles como el 2-hexanal.

Las plantas sintetizan dichos compuestos volátiles mediante una ruta común para la síntesis de oxilipinas y también del JA. Loxd es una lipooxigenasa de tomate que participa en las primeras etapas de la ruta de las oxilipinas. Por homología de secuencia con lox3 de patata se cree que está en los tilacoides del cloroplasto y que cataliza la conversión de ácido linolénico a ácido 13-hidroperoxilínolénico (Heitz y col., 1997; Royo y col., 1996; Farmaki y col., 2007). Ambas lipooxigenasas comparten homología con AtLox2, de Arabidopsis (Heitz y col., 1997; Royo y col., 1996). Algunos de estos productos (ácidos grasos con grupo hidroperóxido en posición 13) tienen propiedades señalizadoras en cebada y tomate (Weichert y col., 1999; Knight y col., 2001).

En judía, la acción de la hidroperóxido liasa sobre estos compuestos lleva a la formación de compuestos volátiles de 6 carbonos con actividad antimicrobiana, tales como el cis-3-hexenol y el trans-2-hexenal (Croft y col., 1993) por una vía independiente de la biosíntesis de JA. Además, se ha descrito para estos volátiles capacidad inductora (Farmer y col., 2001; Farmer y col., 2003).

Por otra parte, otras lipooxigenasas convierten estos ácidos grasos con grupo hidroperóxido en posición 13 en cetotrienos electrofílicos (13-KOT), que inducen genes de defensa en *Arabidopsis* (Vollenweider y col., 2000, Almeras y col., 2003). Recientemente se ha encontrado que algunos de estos compuestos, así como las oxilipinas que se forman por acción de las reductasas, (entre ellas 13-HOT, 13-HOD y 9-HOT) producen un hipercurvamiento de la raíz en *Arabidopsis* (Vellosillo y col., 2007). 9-HOT produjo el fenotipo más agudo e indujo la deposición de calosa en la raíz y en las hojas (Vellosillo y col., 2007). Los autores caracterizaron el mutante *nonresponding to oxilipins (noxy2)*, que no respondía a 9-HOT ni a las otras oxilipinas testadas y resultó ser más susceptible a *Pseudomonas syringae*. Los autores concluyeron, además, que los mecanismos de respuesta a 9-HOT y a las demás oxilipinas eran activados por una ruta independiente de JA.

Además, se ha demostrado que varias de estas oxilipinas tienen actividad antimicrobiana *in vitro* contra varios patógenos de plantas, incluido *B. cinerea* (Prost y col., 2005).

Todas estas observaciones denotan que la inducción de *LoxD* puede promover diversas rutas de síntesis de oxilipinas, independientemente de JA, que tienen tanto propiedades antifúngicas como señalizadoras, capaces de inducir incluso la acumulación de calosa.

De acuerdo con estas premisas, el ácido hexanoico podría inducir resistencia en tomate a *B. cinerea*, provocando un aumento de la expresión de *Loxd* y de la deposición de calosa, a través de rutas de oxilipinas que fueran independientes de JA. Esto sería consistente con que el mutante deficiente en JA *def1*, cuya mutación afecta a una etapa posterior a *LoxD*, siga mostrando la resistencia inducida por el ácido hexanoico. Por su estructura química, el ácido hexanoico incluso podría interferir en la síntesis de dichos compuestos volátiles hexacarbonados o constituir un análogo estructural de los mismos en la inducción de las respuestas.

La demostración de estas hipótesis, así como el papel del ABA en la IR mediada por el ácido hexanoico, requerirán investigaciones adicionales.

El ácido hexanoico como tratamiento preventivo y curativo en tomate

La cualidad más destacada de la capacidad antifúngica del ácido hexanoico es la fuerte reducción de los síntomas de infección en las plantas de tomate, no sólo como tratamiento preventivo, sino también cuando ya se han manifestado los primeros síntomas de infección. El ácido hexanoico produjo un efecto curativo, tanto en plantas jóvenes de tomate (cv. Ailsa Craig), como en plantas desarrolladas con fruto del cultivar Microtom, así como en frutos de tomate cosechados en varios estados de maduración (cv. Ailsa Craig). Si bien pocos compuestos poseen al mismo tiempo capacidad inductora y fungicida, entre los fungicidas pocos tienen capacidad curativa. El quitosano, que tiene efecto inductor y fungicida, inhibió la infección por *B. cinerea* en plantas de pepino al inocular una hora después de tratar las hojas por spray, pero ya no se observó efecto cuando el tratamiento se aplicaba 24 h después de la inoculación, sugiriendo que una vez que las esporas estaban bien establecidas en el tejido el quitosano no tenía efecto curativo (Ben-Salom y col., 2003). Por otra parte, el Pirimetanil ha sido recientemente aprobado para el control de la podredumbre verde causada por *Penicillium digitatum* en cítricos. Este compuesto tiene una gran capacidad curativa, inhibiendo *Penicillium expansum* al tratar 24 h después de su inoculación en cítricos (Smilanick y col., 2006). En el caso del ácido hexanoico, el tratamiento previo realizado por spray 30 minutos antes de la inoculación redujo el halo de necrosis producido tras la infección por *Botrytis cinerea* en más del 50% y cuando el tratamiento se aplicó 48 h después de la inoculación, la diferencia en el área de necrosis entre las plantas tratadas y no tratadas alcanzaba un 30 % a las 24 h de avance de la infección.

Es importante destacar que las concentraciones de ácido hexanoico utilizadas en los ensayos realizados están en el rango de aplicación en campo de muchos compuestos fungicidas utilizados para el control de *B. cinerea*, tales como el Captan, Tolilfluánid, Tiram y el Zinc dimetil-ditiocarbamato (Walter y col., 2005; Sholberg y col., 2005). También es prometedor el hecho de que las concentraciones de ácido hexanoico aplicadas no resulten tóxicas para las plantas, ni afecten aparentemente a los frutos. Obviamente deben ser realizados estrictos análisis para evaluar la seguridad toxicológica y medioambiental del ácido hexanoico, pero los resultados obtenidos lo señalan como un buen candidato para el diseño y desarrollo de tratamientos de plantas de tomate en campo, así como para la aplicación en postcosecha.

Reuniendo los resultados obtenidos, podemos concluir que el ácido hexanoico incrementa la protección de las plantas de tomate a través de dos efectos. Por una

parte, induciendo mecanismos de resistencia frente a la infección por *Botrytis cinerea* y por otra parte, inhibiendo directamente el desarrollo del patógeno. Se ha demostrado que el nivel de resistencia inducida en tomate por el ácido hexanoico es comparable a la producida por el BABA y que, al igual que éste, tiene un efecto de cebado o *priming* en la planta, induciendo la acumulación de calosa en los puntos de penetración del patógeno. En su mecanismo de acción podría estar implicado el ácido abscísico, al igual que ocurre con el BABA en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, los datos de que se dispone hasta el momento parecen indicar que la acción del ácido hexanoico no está mediada por las ruta de señalización dependientes de JA y SA. El ácido hexanoico presenta también una actividad fungicida, inhibiendo tanto la germinación de las esporas como el crecimiento del micelio de *B. cinerea*, lo que explica su eficacia en el control preventivo y curativo del patógeno. El mecanismo de acción fungicida del ácido hexanoico parece estar relacionado con la permeabilización de las membranas del hongo.

CONCLUSIONES

- ⊖ La ausencia de las EGasas Cel1 y Cel2 disminuye la susceptibilidad frente a *B. cinerea* en planta de tomate.
- ⊖ La resistencia promovida por la ausencia de Cel1 y Cel2 en las plantas de tomate frente a *B. cinerea* se correlaciona con un incremento en la deposición de calosa en la zona de infección.
- ⊖ La ausencia de las EGasas Cel1 y Cel2 produce un incremento en la acumulación de los transcritos de *PR1* y *LoxD*.
- ⊖ La expresión de Cel2 sobre el fondo genético *rin* aumenta la susceptibilidad del fruto de tomate frente a *B. cinerea*.
- ⊖ El monoéster etílico del ácido adípico (AAME) inhibe la germinación de las esporas de *Botrytis cinerea* de forma dependiente de la concentración y del pH, habiéndose determinado una mínima concentración fungicida de 16mM.
- ⊖ El AAME también inhibe el crecimiento del micelio de *B. cinerea*, produciendo una alteración en la permeabilidad de las membranas del hongo.
- ⊖ El AAME inhibe el crecimiento de *Botrytis cinerea*, tanto *in vitro*, como sobre fruto de tomate, lo que apoya su uso potencial como tratamiento fungicida.
- ⊖ El ácido hexanoico es un inductor de la resistencia de las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) frente a *Botrytis cinerea*.
- ⊖ La resistencia inducida en tomate por el ácido hexanoico tiene un efecto de cebado o *priming* en la planta, induciendo la acumulación de calosa en los puntos de penetración del patógeno. Asimismo, incrementa los transcritos de *PR1* y *Loxd*.
- ⊖ La señalización dependiente de ácido abscísico parece estar implicada en el mecanismo de acción del ácido hexanoico.

- ⊖ El ácido hexanoico presenta también actividad fungicida, a concentraciones superiores a las que ejerce efecto inductor, inhibiendo tanto la germinación de las esporas como el crecimiento del micelio de *B. cinerea*. Este efecto parece estar relacionado con la permeabilización de las membranas del hongo.
- ⊖ El ácido hexanoico protege de manera preventiva y curativa frente a *B. cinerea* en plantas jóvenes de tomate cv. Ailsa Craig, así como en plantas desarrolladas con fruto, del cultivar MicroTom. También es eficaz en frutos de tomate cv. Ailsa Craig cosechados en varios estados de maduración.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe,H., Urao,T., Ito,T., Seki,M., Shinozaki,K., and Yamaguchi-Shinozaki,K. (2003)** Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**:63-78.
- Abramovitch,R.B. and Martin,G.B. (2004)** Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **7**:356-364.
- Achuo,E.A., Audenaert,K., Meziane,H., and Hofte,M. (2004)** The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology* **53**:65-72.
- Achuo,E.A., Prinsen,E., and Hofte,M. (2006)** Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathology* **55**:178-186.
- Ade,J., DeYoung,B.J., Golstein,C., and Innes,R.W. (2007)** Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:2531-2536.
- Adie,B.A., Perez-Perez,J., Perez-Perez,M.M., Godoy,M., Sanchez-Serrano,J.J., Schmelz,E.A., and Solano,R. (2007)** ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**:1665-1681.
- Adrian,M., Jeandet,P., Veneau,J., Weston,L.A., and Bessis,R. (1997)** Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology* **23**:1689-1702.
- Agrios, G.N. (1988)** Plant Pathology. Academic Press, London,UK.
- Aguero,C.B., Uratsu,S.L., Greve,C., Powell,A.L.T., Labavitch,J.M., Meredith,C.P., and Dandekar,A.M. (2005)** Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Molecular Plant Pathology* **6**:43-51.
- Ahn,I.P., Lee,S.W., and Suh,S.C. (2007)** Rhizobacteria-induced priming in Arabidopsis is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**:759-768.
- Alcalde,E. and Camara,M. (2007)** 10 years of Bt maize - The case of Spain. *Journal of Biotechnology* **131**:S21-S22.
- Alexander,D., Goodman,R.M., Gutrella,M., Glascock,C., Weymann,K., Friedrich,L., Maddox,D., Ahlgoy,P., Luntz,T., Ward,E., and Ryals,J. (1993)** Increased Tolerance to 2 Oomycete Pathogens in Transgenic Tobacco Expressing Pathogenesis-Related Protein-1A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:7327-7331.
- Almenar,E., Auras,R., Wharton,P., Rubino,M., and Harte,B. (2007)** Release of acetaldehyde from beta-cyclodextrins inhibits postharvest decay fungi in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:7205-7212.
- Almeras,E., Stolz,S., Vollenweider,S., Reymond,P., Mene-Saffrane,L., and Farmer,E.E. (2003)** Reactive electrophile species activate defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Journal* **34**:202-216.

Aloni,R., Wolf,A., Feigenbaum,P., Avni,A., and Klee,H.J. (1998) The Never ripe mutant provides evidence that tumor-induced ethylene controls the morphogenesis of *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls on tomato stems. *Plant Physiology* **117**:841-849.

Alonso,J.M. and Stepanova,A.N. (2004) The ethylene signaling pathway. *Science* **306**:1513-1515.

Altomare,C., Cellamare,S., Summo,L., Catto,M., Carotti,A., Thull,U., Carrupt,P.A., Testa,B., and Stoeckli-Evans,H. (1998) Inhibition of monoamine oxidase-B by condensed pyridazines and pyrimidines: Effects of lipophilicity and structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* **41**:3812-3820.

Altomare,C., Perrone,G., Zonno,M.C., Evidente,A., Pengue,R., Fanti,F., and Polonelli,L. (2000) Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*. *Journal of Natural Products* **63**:1131-1135.

Anderson,J.P., Badruzsauhari,E., Schenk,P.M., Manners,J.M., Desmond,O.J., Ehlert,C., Maclean,D.J., Ebert,P.R., and Kazan,K. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**:3460-3479.

Arimura,G., Ozawa,R., Kugimiya,S., Takabayashi,J., and Bohlmann,J. (2004) Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)-beta-ocimene and transcript accumulation of (E)-beta-ocimene synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **135**:1976-1983.

Arras,G. and Usai,M. (2001) Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: Chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection* **64**:1025-1029.

Asada,K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**:601-639.

Asai,T., Tena,G., Plotnikova,J., Willmann,M.R., Chiu,W.L., Gomez-Gomez,L., Boller,T., Ausubel,F.M., and Sheen,J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**:977-983.

Asselbergh,B., Achuo,A.E., Hofte,M., and Van Gijsegem,F. (2008) Abscisic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant Pathology* **9**:11-24.

Audenaert,K., Pattery,T., Cornelis,P., and Hofte,M. (2002)a Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**:1147-1156.

Audenaert,K., De Meyer,G.B., and Hofte,M.M. (2002)b Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* **128**:491-501.

Austin,M.J., Muskett,P., Kahn,K., Feys,B.J., Jones,J.D.G., and Parker,J.E. (2002) Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science* **295**:2077-2080.

Aver'yanov,A.A., Lapikova,V.P., Nikolaev,O.N., and Stepanov,A.I. (2000) Active oxygen-associated control of rice blast disease by riboflavin and roseoflavin. *Biochemistry-Moscow* **65**:1292-1298.

- Axtell, M.J. and Staskawicz, B.J. (2003)** Initiation of RPS2-specified disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**:369-377.
- Ayres, P.G. and Woolacott, B. (1980)** Effects of Soil-Water Level on the Development of Adult-Plant Resistance to Powdery Mildew in Barley. *Annals of Applied Biology* **94**:255-263.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2002)** The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* **295**:2073-2076.
- Baker, S.J., Newton, A.C., Crabb, D., Guy, D.C., Jefferies, R.A., Mackerron, D.K.L., Thomas, W.T.B., and Gurr, S.J. (1998)** Temporary partial breakdown of mlo-resistance in spring barley by sudden relief of soil water-stress under field conditions: the effects of genetic background and mlo allele. *Plant Pathology* **47**:401-410.
- Baldwin, I.T. (1998)** Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:8113-8118.
- Baldwin, I.T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C.C., and Preston, C.A. (2006)** Volatile signaling in plant-plant interactions: "Talking trees" in the genomics era. *Science* **311**:812-815.
- Bang, U. (1995)** Essential oils as fungicides and sprout inhibitors in potatoes. In: Proceedings of the EAPR Pathology Section Meeting, Phytophthora infestans ISO, Dublin, 10–16 September.
- Baird-Parker, A. C. (1980)** Organic acids. In J. H. Silliker, R. P. Elliott, A. C. Baird-Parker, Fil. Bryan, J. H. B. Christian, D. S. Clark, J. C. Olson, & T. R. Roberts (Eds.), *Microbial Ecology of Foods* (pp. 126–135). New York: Academic Press.
- Barnun, N. and Mayer, A.M. (1990)** Cucurbitacins Protect Cucumber Tissue Against Infection by Botrytis-Cinerea. *Phytochemistry* **29**:787-791.
- Baydar, N.G., Ozkan, G., and Sagdic, O. (2004)** Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control* **15**:335-339.
- Belles, J.M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J., and Conejero, V. (1999)** Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**:227-235.
- Belles, J.M., Garro, R., Pallas, V., Fayos, J., Rodrigo, I., and Conejero, V. (2006)** Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta* **223**:500-511.
- Ben-Salom, N and Ardi, R. Pinto R. Aki C. and Fallik E.** Controlling gray mould caused by Botrytis cinerea in cucumber plants by means of chitosan. 2003.
- Benhamou, N. and Chet, I. (1996)** Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* **86**:405-416.
- Bender, C.L., arcon-Chaidez, F., and Gross, D.C. (1999)** Pseudomonas syringae phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**:266-+.

Benito,E.P., ten Have,A., van't Klooster,J.W., and van Kan,J.A.L. (1998) Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 207-220.

Bent,A.F., Innes,R.W., Ecker,J.R., and Staskawicz,B.J. (1992) Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol Plant Microbe Interact.* **5**: 372-378.

Bent,A.F. (1996) Plant disease resistance genes: Function meets structure. *Plant Cell* **8**: 1757-1771.

Bergeron,C., Marston,A., Hakizamungu,E., and Hostettmann,K. (1995) Antifungal Constituents of *Chenopodium-Procerum*. *International Journal of Pharmacognosy* **33**: 115-119.

Berna,A. and Bernier,F. (1997) Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: Oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein. *Plant Molecular Biology* **33**: 417-429.

Berrocal-Lobo,M., Molina,A., and Solano,R. (2002) Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* **29**: 23-32.

Bessire,M., Chassot,C., Jacquat,A.C., Humphry,M., Borel,S., Petetot,J.M.C., Metraux,J.P., and Nawrath,C. (2007) A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *Embo Journal* **26**: 2158-2168.

Bestwick,C.S., Brown,I.R., Bennett,M.H.R., and Mansfield,J.W. (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* **9**: 209-221.

Bisgrove,S.R., Simonich,M.T., Smith,N.M., Sattler,A., and Innes,R.W. (1994) A Disease Resistance Gene in *Arabidopsis* with Specificity for 2 Different Pathogen Avirulence Genes. *Plant Cell* **6**: 927-933.

Blair,D.E., Hekmat,O., Schuttelkopf,A.W., Shrestha,B., Tokuyasu,K., Withers,S.G., and vanAalten,D.M.F. (2006) Structure and Mechanism of Chitin Deacetylase from the Fungal Pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry* **45**: 9416-9426.

Bleecker,A.B. and Kende,H. (2000) Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**: 1-+.

Bohlmann,H. (1994) The Role of Thionins in Plant-Protection. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**: 1-16.

Bohman S, Staal J, Thomma BP, Wang M, Dixelius C. (2004) Characterisation of an *Arabidopsis-Leptosphaeria maculans* pathosystem: resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant J.* **37**: 9-20.

Boller,T. (1995) Chemoperception of Microbial Signals in Plant-Cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 189-214.

Borges,A.A., Cools,H.J., and Lucas,J.A. (2003) a Menadione sodium bisulphite: a novel plant defence activator which enhances local and systemic resistance to infection by *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Plant Pathology* **52**: 429-436.

- Borges,A.A., Borges-Perez,A., and Fernandez-Falcon,M. (2003)** Effect of menadione sodium bisulfite, an inducer of plant defenses, on the dynamic of banana phytoalexin accumulation during pathogenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:5326-5328.
- Borges,A.A., Borges-Perez,A., and Fernandez-Falcon,M. (2004)** Induced resistance to Fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments. *Crop Protection* **23**:1245-1247.
- Bostock,R.M., Wilcox,S.M., Wang,G., and Adaskaveg,J.E. (1999)** Suppression of *Monilinia fruticola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **54**:37-50.
- Bostock,R.M. (2005)** Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. *Annual Review of Phytopathology* **43**:545-580.
- Bouchra,C., Achouri,M., Hassani,L.M.I., and Hmamouchi,M. (2003)** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers : Fr. *Journal of Ethnopharmacology* **89**:165-169.
- Bracey,D., Holyoak,C.D., Nebe-von Caron,G., and Coote,P.J. (1998)** Determination of the intracellular pH (pH(i)) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of reduced-expression of the membrane H⁺-ATPase. *Journal of Microbiological Methods* **31**:113-125.
- Bradford,M.M. (1976)** Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Brent, K. J. and Hollomon D. W. (1998)** Fungicide resistance: the assessment of risk.
- Brito,N., Espino,J.J., and Gonzalez,C. (2006)** The endo-beta-1,4-xylanase xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**:25-32.
- Broekaert,W.F., Delaure,S.L., De Bolle,M.F.C., and Cammuel,B.P.A. (2006)** The role of ethylene in host-pathoven interactions. *Annual Review of Phytopathology* **44**:393-416.
- Brogden,K.A. (2005)** Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**:238-250.
- Broglie,K.E., Biddle,P., Cressman,R., and Broglie,R. (1989)** Functional-Analysis of Dna-Sequences Responsible for Ethylene Regulation of A Bean Chitinase Gene in Transgenic Tobacco. *Plant Cell* **1**:599-607.
- Brown,W. (1965)** Toxins and Cell-Wall Dissolving Enzymes in Relation to Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology* **3**:1-&.
- Bruce,R.J. and West,C.A. (1982)** Elicitation of Casbene Synthetase-Activity in Castor Bean - the Role of Pectic Fragments of the Plant-Cell Wall in Elicitation by A Fungal Endopolygalacturonase. *Plant Physiology* **69**:1181-1188.
- Brummell,D.A., Catala,C., Lashbrook,C.C., and Bennett,A.B. (1997)** A membrane-anchored E-type endo-1,4-beta-glucanase is localized on Golgi and plasma membranes of higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:4794-4799.
- Brummell,D.A., Hall,B.D., and Bennett,A.B. (1999)** Antisense suppression of tomato endo-1,4-beta-glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Molecular Biology* **40**:615-622.

- Brummell,D.A. and Harpster,M.H. (2001)** Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **47**: 311-340.
- Bryk,H., Dyki,B., and Sobiczewski,P. (1998)** Antagonistic effect of *Erwinia herbicola* on in vitro spore germination and germ tube elongation of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Biocontrol* **43**: 97-106.
- Buchanan-Wollaston,V., Earl,S., Harrison,E., Mathas,E., Navabpour,S., Page,T., and Pink,D. (2003)** The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**: 3-22.
- Buchanan,R.L., Smith,J.L., and Long,W. (2000)** Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. *International Journal of Food Microbiology* **58**: 159-172.
- Buchenauer,H. (1978)** Inhibition of Ergosterol Biosynthesis by Triadimenol in *Ustilago-Avenae*. *Pesticide Science* **9**: 507-512.
- Butt,A., Mousley,C., Morris,K., Beynon,J., Can,C., Holub,E., Greenberg,J.T., and Buchanan-Wollaston,V. (1998)** Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* **16**: 209-221.
- Buttery,R.G. and Ling,L.C. (1993)** Volatile Components of Tomato Fruit and Plant-Parts - Relationship and Biogenesis. *Acs Symposium Series* **525**: 23-34.
- Cameron,R.K., Paiva,N.L., Lamb,C.J., and Dixon,R.A. (1999)** Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato in *Arabidopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 121-130.
- Cantu,D., Vicente,A.R., Greve,L.C., Dewey,F.M., Bennett,A.B., Labavitch,J.M., and Powell,A.L.T. (2008)** The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 859-864.
- Cao,H., Bowling,S.A., Gordon,A.S., and Dong,X.N. (1994)** Characterization of An *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired-Resistance. *Plant Cell* **6**: 1583-1592.
- Cao,H., Glazebrook,J., Clarke,J.D., Volko,S., and Dong,X.N. (1997)** The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**: 57-63.
- Catala,C., Rose,J.K.C., and Bennett,A.B. (1997)** Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4-beta-D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant Journal* **12**: 417-426.
- Chae,H.S. and Kieber,J.J. (2005)** Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends in Plant Science* **10**: 291-296.
- Chakravarthy,S., Tuori,R.P., D'Ascenzo,M.D., Fobert,P.R., Despres,C., and Martin,G.B. (2003)** The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell* **15**: 3033-3050.
- Chang,J.H., Tobias,C.M., Staskawicz,B.J., and Michelmore,R.W. (2001)** Functional studies of the bacterial avirulence protein AvrPto by mutational analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 451-459.

- Chapeland,F., Fritz,R., Lanen,C., Gredt,M., and Leroux,P. (1999)** Inheritance and mechanisms of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **64**: 85-100.
- Chen,H., Xiao,X., Wang,J., Wu,L.J., Zheng,Z.M., and Yu,Z.L. (2008)** Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnology Letters* **30**: 919-923.
- Chen,J.L., Yan,S.J., Feng,Z.S., Xiao,L.X., and Hu,X.S. (2006)** Changes in the volatile compounds and chemical and physical properties of Yali pear (*Pyrus bertschneideri* Rehd) during storage. *Food Chemistry* **97**: 248-255.
- Chen,S.C., Liu,A.R., and Zou,Z.R. (2006)** Overexpression of glucanase gene and defensin gene in transgenic tomato enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**: 671-677.
- Chen,Y.F., Etheridge,N., and Schaller,G.E. (2005)** Ethylene signal transduction. *Ann.Bot. (Lond)* **95**: 901-915.
- Chen,Z.X., Silva,H., and Klessig,D.F. (1993)** Active Oxygen Species in the Induction of Plant Systemic Acquired-Resistance by Salicylic-Acid. *Science* **262**: 1883-1886.
- Chen,Z.Z., Hong,X.H., Zhang,H.R., Wang,Y.Q., Li,X., Zhu,J.K., and Gong,Z.Z. (2005)** Disruption of the cellulose synthase gene, *AtCesA8/IRX1*, enhances drought and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **43** : 273-283.
- Chern,M.S., Fitzgerald,H.A., Yadav,R.C., Canlas,P.E., Dong,X.N., and Ronald,P.C. (2001)** Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **27**: 101-113.
- Chini,A., Grant,J.J., Seki,M., Shinozaki,K., and Loake,G.J. (2004)** Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, *ADR1*, requires salicylic acid, *EDS1* and *ABI1*. *Plant Journal* **38**: 810-822.
- Chini,A., Fonseca,S., Fernandez,G., Adie,B., Chico,J.M., Lorenzo,O., Garcia-Casado,G., Lopez-Vidriero,I., Lozano,F.M., Ponce,M.R., Micol,J.L., and Solano,R. (2007)** The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671.
- Choh,Y., Shimoda,T., Ozawa,R., Dicke,M., and Takabayashi,J. (2004)** Exposure of lima bean leaves to volatiles from herbivore-induced conspecific plants results in emission of carnivore attractants: Active or passive process? *Journal of Chemical Ecology* **30**: 1305-1317.
- Chu,C.L., Liu,W.T., Zhou,T., and Tsao,R. (1999)** Control of postharvest gray mold rot of modified atmosphere packaged sweet cherries by fumigation with thymol and acetic acid. *Canadian Journal of Plant Science* **79**: 685-689.
- Clarke JD,Volko SM, Ledford H, Ausubel FM, Dong X. (2000)** Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 2175–90.
- Clergeot,P.H., Gourgues,M., Cots,J., Laurans,F., Latorse,M.P., Pepin,R., Tharreau,D., Notteghem,J.L., and Lebrun,M.H. (2001)** PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6963-6968.
- Coego,A., Ramirez,V., Gil,M.J., Flors,V., Mauch-Mani,B., and Vera,P. (2005)a** An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor, *OVEREXPRESSION OF CATIONIC PEROXIDASE 3*, mediates resistance to infection by necrotrophic pathogens. *Plant Cell* **17**: 2123-2137.

Coego,A., Ramirez,V., Ellul,P., Mayda,E., and Vera,P. (2005)b The H₂O₂-regulated Ep5C gene encodes a peroxidase required for bacterial speck susceptibility in tomato. *Plant Journal* **42**:283-293.

Cohen,Y., Gisi,U., and Niderman,T. (1993) Local and Systemic Protection Against Phytophthora-Infestans Induced in Potato and Tomato Plants by Jasmonic Acid and Jasmonic Methyl-Ester. *Phytopathology* **83**:1054-1062.

Cohen,Y., Niderman,T., Mosinger,E., and Fluhr,R. (1994) Beta-Aminobutyric Acid Induces the Accumulation of Pathogenesis-Related Proteins in Tomato (*Lycopersicon-Esculentum* L.) Plants and Resistance to Late Blight Infection Caused by Phytophthora-Infestans. *Plant Physiology* **104**:59-66.

Cohen, Y. (1998) Synergistic fungicidal mixtures of selected amino acids. Israel Patent 123346.

Cohen,Y.R. (2002) beta-aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Disease* **86**:448-457.

Cohn,J.R. and Martin,G.B. (2005) Pseudomonas syringae pv. tomato type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant Journal* **44**:139-154.

Cohn, J., Sessa, G., Martin, G.B. (2001) Innate immunity in plants. *Current Opinion in Immunology* **13**:55-62.

Collins,N.C., Thordal-Christensen,H., Lipka,V., Bau,S., Kombrink,E., Qiu,J.L., Huckelhoven,R., Stein,M., Freialdenhoven,A., Somerville,S.C., and Schulze-Lefert,P. (2003) SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* **425**:973-977.

Colmenares,A.J., Aleu,J., Duran-Patron,R., Collado,I.G., and Hernandez-Galan,R. (2002)a The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of Botrytis cinerea. *Journal of Chemical Ecology* **28**:997-1005.

Colmenares,A.J., Duran-Patron,R.M., Hernandez-Galan,R., and Collado,I.G. (2002)b Four new Lactones from Botrytis cinerea. *Journal of Natural Products* **65**:1724-1726.

Conejero V, Bellés JM, García-Breijo F, Garro R, Hernández-Yago J, Rodrigo I, Vera P. (1990) Signalling in viroid pathogenesis. In: Fraser RSS (eds) Recognition and response in plant-virus interactions. Springer, Berlin Heidelberg New York pp 233–261.

Conrath,U., Thulke,O., Katz,V., Schwindling,S., and Kohler,A. (2001) Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology* **107**:113-119.

Conrath,U., Pieterse,C.M.J., and Mauch-Mani,B. (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **7**:210-216.

Conrath,U., Beckers,G.J.M., Flors,V., Garcia-Agustin,P., Jakab,G., Mauch,F., Newman,M.A., Pieterse,C.M.J., Poinssot,B., Pozo,M.J., Pugin,A., Schaffrath,U., Ton,J., Wendehenne,D., Zimmerli,L., and Mauch-Mani,B. (2006) Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**:1062-1071.

Cooper,W., Bouzayen,M., Hamilton,A., Barry,C., Rossall,S., and Grierson,D. (1998) Use of transgenic plants to study the role of ethylene and polygalacturonase during infection of tomato fruit by Colletotrichum gloeosporioides. *Plant Pathology* **47**:308-316.

- Coquoz, J.L., Buchala, A., and Metraux, J.P. (1998)** The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiology* **117**: 1095-1101.
- Cosgrove, D.J. (2005)** Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 850-861.
- Cotoras, M., Garcia, C., Lagos, C., Folch, C., and Mendoza, L. (2001)** Antifungal activity on *Botrytis cinerea* of flavonoids and diterpenoids isolated from the surface of *Pseudognaphalium* spp. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* **46**: 433-440.
- Cotoras, M., Folch, C., and Mendoza, L. (2004)** Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 beta-hydroxy-kaurenoic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 2821-2826.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E. (1997)** BIOSYNTHESIS AND ACTION OF JASMONATES IN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol.* **48**: 355-381.
- Crocoll, C., Kettner, J., and Dorffling, K. (1991)** Abscisic-Acid in Saprophytic and Parasitic Species of Fungi. *Phytochemistry* **30**: 1059-1060.
- Croft, K.P.C., Juttner, F., and Slusarenko, A.J. (1993)** Volatile Products of the Lipoxygenase Pathway Evolved from *Phaseolus-Vulgaris* (L) Leaves Inoculated with *Pseudomonas-Syringae* Pv-*Phaseolicola*. *Plant Physiology* **101**: 13-24.
- Cruz Castillo M, Martinez C, Buchala A, Metraux JP, Leon J (2004)**. Genespecific involvement of β -oxidation in wound-activated responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **135**: 85-94.
- Dacol L, Gibbard M, Hodson MO and Knight S. (1998)** Azoxystrobin: development of horticultural crops in Europe, in Proc Brighton Crop Protect Conf – Pests Dis, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp 843–848.
- Darvill, A.G. and Albersheim, P. (1984)** Phytoalexins and Their Elicitors - A Defense Against Microbial Infection in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **35**: 243-275.
- Day, B., Dahlbeck, D., Huang, J., Chisholm, S.T., Li, D.H., and Staskawicz, B.J. (2005)** Molecular basis for the RIN4 negative regulation of RPS2 disease resistance. *Plant Cell* **17**: 1292-1305.
- De Bary, A. (1886)** Ueber einige Sclerotinien und Sclerotienkrankheiten. *Botanische Zeitschrift* **44**: 377–474
- de Capdeville, G., Wilson, C.L., Beer, S.V., and Aist, J.R. (2002)** Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. *Phytopathology* **92**: 900-908.
- de Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnov, N., and Talbot, N.J. (1997)** Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**: 244.
- de Meaux, J. and Mitchell-Olds, T. (2003)** Evolution of plant resistance at the molecular level: ecological context of species interactions. *Heredity* **91**: 345-352.
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Egea, P.R., Bogre, L., and Grant, M. (2007)** *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *Embo Journal* **26**: 1434-1443.

de Victoria, J. and M. Galván. (2003) Preliminary testing of a rapid coupled methodology for quantification/viability determination of helminth eggs in raw and treated wastewater. *Water Res.* **37**: 1278-1287.

de Waard, M.A., Andrade, A.C., Hayashi, K., Schoonbeek, H.J., Stergiopoulos, I., and Zwiers, L.H. (2006) Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Management Science* **62**: 195-207.

Debener, T., Salamini, F., and Gebhardt, C. (1991) The Use of Rflps (Restriction-Fragment-Length-Polymorphisms) Detects Germplasm Introgressions from Wild-Species Into Potato (*Solanum-Tuberosum* Ssp *Tuberosum*) Breeding Lines. *Plant Breeding* **106**: 173-181.

Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gutrella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. (1994) A Central Role of Salicylic-Acid in Plant-Disease Resistance. *Science* **266**: 1247-1250.

Delaney, T.P., Friedrich, L., and Ryals, J.A. (1995) Arabidopsis Signal-Transduction Mutant Defective in Chemically and Biologically Induced Disease Resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 6602-6606.

Delaquis, P.J. and Mazza, G. (1995) Antimicrobial Properties of Isothiocyanates in Food Preservation. *Food Technology* **49**: 73-&.

delCampillo, E. and Bennett, A.B. (1996) Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. *Plant Physiology* **111**: 813-820.

Dellapenna, D., Lincoln, J.E., Fischer, R.L., and Bennett, A.B. (1989) Transcriptional Analysis of Polygalacturonase and Other Ripening Associated Genes in Rutgers, Rin, Nor, and Nr Tomato Fruit. *Plant Physiology* **90**: 1372-1377.

Dempsey, D.A., Shah, J., and Klessig, D.F. (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 547-575.

Desaki, Y., Venkatesh, B., Tsuyumu, S., Yamane, H., Minami, E., Kiribuchi, K., Kaku, H., and Shibuya, N. (2006) Activation and potentiation of defense responses in suspension-cultured rice cells by bacterial lipopolysaccharides. *Plant and Cell Physiology* **47**: S82.

Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y. (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 2404-2409.

Despres, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., and Fobert, P.R. (2000) The arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* **12**: 279-290.

Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., and Fobert, P.R. (2003) The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* **15**: 2181-2191.

Desveaux, D., Subramaniam, R., Despres, C., Mess, J.N., Levesque, C., Fobert, P.R., Dangl, J.L., and Brisson, N. (2004) A "whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. *Developmental Cell* **6**: 229-240.

- Dias,B.B.A., Cunha,W.G., Morais,L.S., Vianna,G.R., Rech,E.L., de Capdeville,G., and Aragao,F.J.L. (2006)** Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* **55**:187-193.
- Diaz,J., ten Have,A., and van Kan,J.A.L. (2002)** The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **129**:1341-1351.
- Dickman,M.B., Park,Y.K., Oltersdorf,T., Li,W., Clemente,T., and French,R. (2001)** Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:6957-6962.
- Dickson,R.C., Sumanasekera,C., and Lester,R.L. (2006)** Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Lipid Research* **45**:447-465.
- Dixon,R.A. (2001)** Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**:843-847.
- Doares,S.H., Syrovets,T., Weiler,E.W., and Ryan,C.A. (1995)a** Oligogalacturonides and Chitosan Activate Plant Defensive Genes Through the Octadecanoid Pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:4095-4098.
- Doares,S.H., Narvaezvasquez,J., Conconi,A., and Ryan,C.A. (1995)b** Salicylic-Acid Inhibits Synthesis of Proteinase-Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiology* **108**:1741-1746.
- Dodds,P.N., Lawrence,G.J., and Ellis,J.G. (2001)** Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat beta-strand/beta-turn motif determine the difference between the P and P2 rust resistance specificities in flax. *Plant Cell* **13**:163-178.
- Doehlemann,G., Molitor,F., and Hahn,M. (2005)** Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology* **42**:601-610.
- Doehlemann,G., Berndt,P., and Hahn,M. (2006)** Different signalling pathways involving a G alpha protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Molecular Microbiology* **59**:821-835.
- Dombrecht,B., Xue,G.P., Sprague,S.J., Kirkegaard,J.A., Ross,J.J., Reid,J.B., Fitt,G.P., Sewelam,N., Schenk,P.M., Manners,J.M., and Kazan,K. (2007)** MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**:2225-2245.
- Dong,H. and Beer,S.V. (2000)** Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology* **90**:801-811.
- Dong,X.N. (2004)** NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* **7**:547-552.
- Donofrio,N.M. and Delaney,T.P. (2001)** Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defense-compromised *Arabidopsis* *nim1-1* and salicylate hydroxylase-expressing plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**:439-450.
- Dorffling,K., Petersen,W., Sprecher,E., Urbasch,I., and Hanssen,H.P. (1984)** Abscisic-Acid in Phytopathogenic Fungi of the Genera *Botrytis*, *Ceratocystis*, *Fusarium*, and *Rhizoctonia*. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* **39**:683-684.
- Doss,R.P., Potter,S.W., Chastagner,G.A., and Christian,J.K. (1993)** Adhesion of Nongerminated *Botrytis-Cinerea* Conidia to Several Substrata. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:1786-1791.

Doss,R.P., Deisenhofer,J., von Nidda,H.A.K., Soeldner,A.H., and McGuire,R.P. (2003) Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **63**:687-691.

Ducci, M., A. Gazzamo, Ch. Villani, V. Cela, P.G. Artini, F. Martelli, A.R. Genazzani. (2002) Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *Eur. J. Obstetrics Gynecol. Reproduct. Biol.* **102**: 53-56.

Dudareva,N. and Negre,F. (2005) Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission. *Current Opinion in Plant Biology* **8**:113-118.

Duijff,B.J., Pouhair,D., Olivain,C., Alabouvette,C., and Lemanceau,P. (1998) Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology* **104**:903-910.

Durner,J. and Klessig,D.F. (1995) Inhibition of Ascorbate Peroxidase by Salicylic-Acid and 2,6-Dichloroisonicotinic Acid, 2 Inducers of Plant Defense Responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:11312-11316.

Durrant,W.E. and Dong,X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**:185-209.

Ecker,J.R. (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**:667-675.

Ekgengren,S.K., Liu,Y.L., Schiff,M., nesh-Kumar,S.P., and Martin,G.B. (2003) Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant Journal* **36**:905-917.

Eklund,T. (1983) The Anti-Microbial Effect of Dissociated and Undissociated Sorbic Acid at Different Ph Levels. *Journal of Applied Bacteriology* **54**:383-389.

Eklund,T. (1985) The Effect of Sorbic Acid and Esters of Para-Hydroxybenzoic Acid on the Protonmotive Force in *Escherichia-Coli* Membrane-Vesicles. *Journal of General Microbiology* **131**:73-76.

Elad,Y., Yunis,H., and Katan,T. (1992) Multiple Fungicide Resistance to Benzimidazoles, Dicarboximides and Diethofencarb in Field Isolates of *Botrytis-Cinerea* in Israel. *Plant Pathology* **41**:41-46.

Elad,Y. (1993) Regulators of Ethylene Biosynthesis Or Activity As A Tool for Reducing Susceptibility of Host-Plant Tissues to Infection by *Botrytis-Cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **99**:105-113.

Elad,Y. and Evensen,K. (1995) Physiological-Aspects of Resistance to *Botrytis-Cinerea*. *Phytopathology* **85**:637-643.

Elad,Y., Gullino,M.L., Shtienberg,D., and Aloï,C. (1995) Managing *Botrytis-Cinerea* on Tomatoes in Greenhouses in the Mediterranean. *Crop Protection* **14**:105-109.

Elghaouth,A., Arul,J., Asselin,A., and Benhamou,N. (1992)a Antifungal Activity of Chitosan on Postharvest Pathogens - Induction of Morphological and Cytological Alterations in *Rhizopus-Stolonifer*. *Mycological Research* **96**:769-779.

Elghaouth,A., Arul,J., Grenier,J., and Asselin,A. (1992)b Antifungal Activity of Chitosan on 2 Postharvest Pathogens of Strawberry Fruits. *Phytopathology* **82**:398-402.

- Ellis,C. and Turner,J.G. (2001)** The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* **13**:1025-1033.
- Ellis,C., Karafyllidis,I., Wasternack,C., and Turner,J.G. (2002)a** The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**:1557-1566.
- Ellis,C., Karafyllidis,L., and Turner,J.G. (2002)b** Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**:1025-1030.
- Ellis,J., Dodds,P., and Pryor,T. (2000)** Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology* **3**:278-284.
- Engelberth,J., Alborn,H.T., Schmelz,E.A., and Tumlinson,J.H. (2004)** Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:1781-1785.
- Epple,P., Apel,K., and Bohlmann,H. (1997)** Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* **9**:509-520.
- Espino,J.J., Brito,N., Noda,J., and Gonzalez,C. (2005)** Botrytis cinerea endo-beta-1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **66**:213-221.
- Eulgem,T., Rushton,P.J., Schmelzer,E., Hahlbrock,K., and Somssich,I.E. (1999)** Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *Embo Journal* **18**:4689-4699.
- Eyal,Y., Meller,Y., Levyadun,S., and Fluhr,R. (1993)** A Basic-Type Pr-1 Promoter Directs Ethylene Responsiveness, Vascular and Abscission Zone-Specific Expression. *Plant Journal* **4**:225-234.
- Faldt,J., Arimura,G., Gershenzon,J., Takabayashi,J., and Bohlmann,J. (2003)** Functional identification of AtTPS03 as (E)-beta-ocimene synthase: a monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in Arabidopsis thaliana. *Planta* **216**:745-751.
- Falk,A., Feys,B.J., Frost,L.N., Jones,J.D.G., Daniels,M.J., and Parker,J.E. (1999)** EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:3292-3297.
- Fan,W.H. and Dong,X.N. (2002)** In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**:1377-1389.
- Faretra,F. and Pollastro,S. (1991)** Genetic-Basis of Resistance to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides in Botryotinia-Fuckeliana (Botrytis-Cinerea). *Mycological Research* **95**:943-951.
- Farmaki,T., Sanmartin,M., Jimenez,P., Paneque,M., Sanz,C., Vancanneyt,G., Leon,J., and Sanchez-Serrano,J.J. (2007)** Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* **58**:555-568.
- Farmer,E.E. (2001)** Surface-to-air signals. *Nature* **411**:854-856.
- Farmer,E.E., Almeras,E., and Krishnamurthy,V. (2003)** Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:372-378.

Felix,G., Duran,J.D., Volko,S., and Boller,T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* **18**:265-276.

Felix,G. and Boller,T. (2003) Molecular sensing of bacteria in plants - The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* **278**:6201-6208.

Fenwick,G.R. and Heaney,R.K. (1983) Glucosinolates and Their Breakdown Products in Cruciferous Crops, Foods and Feedingstuffs. *Food Chemistry* **11**:249-271.

Fernandez-Falcon,M., Borges,A.A., and Borges-Perez,A. (2003) Induced resistance to Fusarium wilt of banana by exogenous applications of indoleacetic acid. *Phytoprotection* **84**:149-153.

Fernando,W.G.D., Ramarathnam,R., Krishnamoorthy,A.S., and Savchuk,S.C. (2005) Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology & Biochemistry* **37**:955-964.

Ferrari,S., Plotnikova,J.M., De Lorenzo,G., and Ausubel,F.M. (2003) Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant Journal* **35**:193-205.

Ferrari,S., Galletti,R., Denoux,C., De Lorenzo,G., Ausubel,F.M., and Dewdney,J. (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology* **144**:367-379.

Feys,B.J. and Parker,J.E. (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* **16**:449-455.

Feys,B.J., Moisan,L.J., Newman,M.A., and Parker,J.E. (2001) Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *Embo Journal* **20**:5400-5411.

Feys,B.J.F., Benedetti,C.E., Penfold,C.N., and Turner,J.G. (1994) Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male-Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to A Bacterial Pathogen. *Plant Cell* **6**:751-759.

Flor,H.H. (1971) Current Status of Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**:275-&.

Flors,V., Miralles,C., Cerezo,M., Gonzalez-Bosch,C., and Garcia-Agustin,P. (2001) Effect of a novel chemical mixture on senescence processes and plant-fungus interaction in solanaceae plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**:2569-2575.

Flors,V., Miralles,M.C., Gonzalez-Bosch,C., Carda,M., and Garcia-Agustin,P. (2003)a Induction of protection against the necrotrophic pathogens *Phytophthora citrophthora* and *Alternaria solani* in *Lycopersicon esculentum* Mill. by a novel synthetic glycoside combined with amines. *Planta* **216**:929-938.

Flors,V., Miralles,C., Gonzalez-Bosch,C., Carda,M., and Garcia-Agustin,P. (2003)b Three novel synthetic amides of adipic acid protect *Capsicum annum* plants against the necrotrophic pathogen *Alternaria solani*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**:151-158.

Flors,V., Miralles,M.C., Varas,E., Company,P., Gonzalez-Bosch,C., and Garcia-Agustin,P. (2004) Effect of analogues of plant growth regulators on in vitro growth of eukaryotic plant pathogens. *Plant Pathology* **53**:58-64.

- Flors,V., Ton,J., Jakab,G., and Mauch-Mani,B. (2005)** Abscisic acid and callose: Team players in defence against pathogens? *Journal of Phytopathology* **153**: 377-383.
- Flors,V., Ton,J., van Doorn,R., Jakab,G., Garcia-Agustin,P., and Mauch-Mani,B. (2008)** Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant Journal* **54**:81-92.
- Fontecave,M., Atta,M., and Mulliez,E. (2004)** S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends in Biochemical Sciences* **29**:243-249.
- Freese,E., Sheu,C.W., and Galliers,E. (1973)** Function of Lipophilic Acids As Antimicrobial Food Additives. *Nature* **241**:321-325.
- Freialdenhoven,A., Peterhansel,C., Kurth,J., Kreuzaler,F., and Schulze-Lefert,P. (1996)** Identification of genes required for the function of non-race-specific mlo resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* **8**:5-14.
- Fritz,R., Lanen,C., Colas,V., and Leroux,P. (1997)** Inhibition of methionine biosynthesis in *Botrytis cinerea* by the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pesticide Science* **49**:40-46.
- Fujita,M., Fujita,Y., Noutoshi,Y., Takahashi,F., Narusaka,Y., Yamaguchi-Shinozaki,K., and Shinozaki,K. (2006)** Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**:436-442.
- Gagne,J.M., Smalle,J., Gingerich,D.J., Walker,J.M., Yoo,S.D., Yanagisawa,S., and Vierstra,R.D. (2004)** Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:6803-6808.
- Gamliel,A. and Katan,J. (1992)** Influence of Seed and Root Exudates on Fluorescent *Pseudomonads* and Fungi in Solarized Soil. *Phytopathology* **82**:320-327.
- García-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M. (1995)** The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* **3**: 72–74.
- Gatehouse,J.A. (2002)** Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist* **156**:145-169.
- Gent,D.H. and Schwartz,H.F. (2005)** Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. *Plant Disease* **89**:631-639.
- Geraats,B.P., Bakker,P.A., and van Loon,L.C. (2002)** Ethylene insensitivity impairs resistance to soilborne pathogens in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact.* **15**:1078-1085.
- Geraats,B.P.J., Bakker,P.A.H.M., Lawrence,C.B., Achuo,E.A., Hofte,M., and van Loon,L.C. (2003)** Ethylene-insensitive tobacco shows differentially altered susceptibility to different pathogens. *Phytopathology* **93**:813-821.
- Germeier,C., Hedke,K., and Vontiedemann,A. (1994)** The Use of Ph-Indicators in Diagnostic Media for Acid-Producing Plant-Pathogens. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* **101**:498-507.

- Ghassemian,M., Nambara,E., Cutler,S., Kawaide,H., Kamiya,Y., and McCourt,P. (2000)** Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in arabidopsis. *Plant Cell* **12**:1117-1126.
- Gibson,S., Falcone,D.L., Browse,J., and Somerville,C. (1994)** Use of Transgenic Plants and Mutants to Study the Regulation and Function of Lipid-Composition. *Plant Cell and Environment* **17**:627-637.
- Glazebrook,J., Rogers,E.E., and Ausubel,F.M. (1996)** Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**:973-982.
- Glazebrook,J. (2001)** Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis - 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* **4**:301-308.
- Glazebrook,J., Chen,W.J., Estes,B., Chang,H.S., Nawrath,C., Metraux,J.P., Zhu,T., and Katagiri,F. (2003)** Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant Journal* **34**:217-228.
- Glazebrook,J. (2005)** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**:205-227.
- Godoy,G., Steadman,J.R., Dickman,M.B., and Dam,R. (1990)** Use of Mutants to Demonstrate the Role of Oxalic-Acid in Pathogenicity of Sclerotinia-Sclerotiorum on Phaseolus-Vulgaris. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**:179-191.
- Gomez-Gomez,L. and Boller,T. (2000)** FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* **5**:1003-1011.
- Gonzalezbosch,C., Brummell,D.A., and Bennett,A.B. (1996)** Differential expression of two endo-1,4-beta-glucanase genes in pericarp and locules of wild-type and mutant tomato fruit. *Plant Physiology* **111**:1313-1319.
- Gonzalezbosch,C., delCampillo,E., and Bennett,A.B. (1997)** Immunodetection and characterization of tomato endo-beta-1,4-glucanase Cel1 protein in flower abscission zones. *Plant Physiology* **114**:1541-1546.
- Gottstein,H.D. and Kuc,J.A. (1989)** Induction of Systemic Resistance to Anthracnose in Cucumber by Phosphates. *Phytopathology* **79**:176-179.
- Gourgues,M., Brunet-Simon,A., Lebrun,M.H., and Levis,C. (2004)** The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of Botrytis cinerea into host plant leaves. *Molecular Microbiology* **51**:619-629.
- Govrin,E.M. and Levine,A. (2000)** The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen Botrytis cinerea. *Current Biology* **10**:751-757.
- Govrin,E.M. and Levine,A. (2002)** Infection of Arabidopsis with a necrotrophic pathogen, Botrytis cinerea, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant Molecular Biology* **48**:267-276.
- Gozzo,F. (2003)** Systemic acquired resistance in crop protection: From nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:4487-4503.
- Grant,J.J., Chini,A., Basu,D., and Loake,G.J. (2003)** Targeted activation tagging of the Arabidopsis NBS-LRR gene, ADR1, conveys resistance to virulent pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**:669-680.

- Grayer,R.J. and Harborne,J.B. (1994)** A Survey of Antifungal Compounds from Higher-Plants, 1982-1993. *Phytochemistry* **37**: 19-42.
- Grechkin,A. (1998)** Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Progress in Lipid Research* **37**: 317-352.
- Green,T.R. and Ryan,C.A. (1972)** Wound Induced Proteinase Inhibitor in Tomato Leaves - Evidence for A Proteinase Inhibitor Inducing Factor. *Federation Proceedings* **31**:A862-&.
- Griffith M, Lumb C,Wiseman SB,Wisniewski M, Johnson RW, et al. (2005)** Antifreeze proteins modify the freezing process in planta. *Plant Physiology* **138**:330-40.
- Griffith,M. and Yaish,M.W.F. (2004)** Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science* **9**: 399-405.
- Gronover,C.S., Kasulke,D., Tudzynski,P., and Tudzynski,B. (2001)** The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**:1293-1302.
- Guo,Z.J., Miyoshi,H., Komyoji,T., Haga,T., and Fujita,T. (1991)** Uncoupling Activity of A Newly Developed Fungicide, Fluzinam [3-Chloro-N-(3-Chloro-2,6-Dinitro-4-Trifluoromethylphenyl)-5-Trifluoromethyl-2-Pyridinamine]. *Biochimica et Biophysica Acta* **1056**: 89-92.
- Gupta,V., Willits,M.G., and Glazebrook,J. (2000)** Arabidopsis thaliana EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: Evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**:503-511.
- Hahn,M.G., Cheong,J.J., Alba,R., and Cote,F. (1994)** Characterization of Hepta-Beta-Glucoside Elicitor-Binding Protein(S) in Soybean. *Biochemical Society Transactions* **22**: 408-414.
- Hain,R., Reif,H.J., Krause,E., Langebartels,R., Kindl,H., Vornam,B., Wiese,W., Schmelzer,E., Schreier,P.H., Stocker,R.H., and Stenzel,K. (1993)** Disease Resistance Results from Foreign Phytoalexin Expression in A Novel Plant. *Nature* **361**: 153-156.
- Hajouj,T., Michelis,R., and Gepstein,S. (2000)** Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiology* **124**:1305-1314.
- Hall,A.E., Findell,J.L., Schaller,G.E., Sisler,E.C., and Bleecker,A.B. (2000)** Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis. *Plant Physiol* **123**:1449-1458.
- Hamiltonkemp,T.R., Mccracken,C.T., Loughrin,J.H., Andersen,R.A., and Hildebrand,D.F. (1992)** Effects of Some Natural Volatile Compounds on the Pathogenic Fungi *Alternaria-Alternata* and *Botrytis-Cinerea*. *Journal of Chemical Ecology* **18**:1083-1091.
- Hammond-Kosack,K.E. and Parker,J.E. (2003)** Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* **14**:177-193.
- Hanssen M. (1987)** E for additives. The complete E number guide. ISBN: 0722511507 Wellingborough: Thorsons.
- Harberd,N.P. (2003)** Botany: Relieving DELLA restraint. *Science* **299**: 1853-1854.
- Harborne,J.B. (1999)** The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology* **27**:335-367.

- Harrison,H.F., Peterson,J.K., Snook,M.E., Bohac,J.R., and Jackson,D.M. (2003)** Quantity and potential biological activity of caffeic acid in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] storage root periderm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:2943-2948.
- Hartmans,K.J., Diepenhorst,P., Bakker,W., and Gorris,L.G.M. (1995)** The Use of Carvone in Agriculture - Sprout Suppression of Potatoes and Antifungal Activity Against Potato-Tuber and Other Plant-Diseases. *Industrial Crops and Products* **4**:3-13.
- Hase,S., Shimizu,A., Nakaho,K., Takenaka,S., and Takahashi,H. (2006)** Induction of transient ethylene and reduction in severity of tomato bacterial wilt by *Pythium oligandrum*. *Plant Pathology* **55**:537-543.
- Hayes,M.P., Enterline,J.C., Gerrard,T.L., and Zoon,K.C. (1991)** Regulation of Interferon-Production by Human Monocytes - Requirements for Priming for Lipopolysaccharide-Induced Production. *Journal of Leukocyte Biology* **50**:176-181.
- Hazen,S.P., Hawley,R.M., Davis,G.L., Henrissat,B., and Walton,J.D. (2003)** Quantitative trait loci and comparative genomics of cereal cell wall composition. *Plant Physiology* **132**:263-271.
- He,P.Q., Tian,L., Chen,K.S., Hao,L.H., and Li,G.Y. (2006)** Induction of volatile organic compounds of *Lycopersicon esculentum* Mill. and its resistance to *Botrytis cinerea* Pers. by burdock oligosaccharide. *Journal of Integrative Plant Biology* **48**:550-557.
- Heath,M.C. (1998)** Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology* **104**:117-124.
- Heil, M., Baldwin, I.T. (2002)** Fitness costs of induced resistance: emergin experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* **7**: 61-67.
- Heitz,T., Bergey,D.R., and Ryan,C.A. (1997)** A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* **114**:1085-1093.
- Hennebert,G.L. and Korf,R.P. (1975)** Peat Mold, *Chromelosporium-Ollare*, Conidial State of *Peziza-Ostracoderma*, and Its Misapplied Names, *Botrytis-Crystallina*, *Botrytis Spectabilis*, *Ostracoderma-Epigaeum* and *Peziza-Atrovinosa*. *Mycologia* **67**:214-240.
- Herde,O., Cortes,H.P., Wasternack,C., Willmitzer,L., and Fisahn,J. (1999)** Electric signaling and Pin2 gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiology* **119**:213-218.
- Hermes,S., Seehaus,K., Koehle,H., and Conrath,U. (2002)** A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Physiology* **130**:120-127.
- Hernandez-Blanco,C., Feng,D.X., Hu,J., Sanchez-Vallet,A., Deslandes,L., Llorente,F., Berrocal-Lobo,M., Keller,H., Barlet,X., Sanchez-Rodriguez,C., Anderson,L.K., Somerville,S., Marco,Y., and Molina,A. (2007)** Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* **19**:890-903.
- Herner,R.C. and Sink,K.C. (1973)** Ethylene Production and Respiratory Behavior of Rin Tomato Mutant. *Plant Physiology* **52**:38-42.
- Hinsch,M. and Staskawicz,B. (1996)** Identification of a new *Arabidopsis* disease resistance locus, RPS4, and cloning of the corresponding avirulence gene, *avrRps4*, from *Pseudomonas syringae* pv *pisii*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**:55-61.

- Hippe-Sanwald, S., Hermanns, M., and Somerville, S.C. (1992)** Ultrastructural comparison of incompatible and compatible interactions in the barley powdery mildew disease. *Protoplasma* **168**: 27–40.
- Hobson, G.E. (1967)** Effects of Alleles at Never Never Ripe Locus on Ripening of Tomato Fruit. *Phytochemistry* **6**: 1337-&.
- Hoffman, R., Roebroek, E., and Heale, J.B. (1988)** Effects of Ethylene Biosynthesis in Carrot Root Slices on 6-Methoxymellein Accumulation and Resistance to Botrytis-Cinerea. *Physiologia Plantarum* **73**: 71-76.
- Hoffmann-Sommergruber, K., Fuchs, H., Ebner, C., Jensen-Jarolim, E., Scheiner, O., and Breiteneder, H. (2001)** Identification of CAP a 1 a new food allergen from bell pepper. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **107**: S183.
- Holyoak, C.D., Bracey, D., Piper, P.W., Kuchler, K., and Coote, P.J. (1999)** The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. *Journal of Bacteriology* **181**: 4644-4652.
- Hon, W.C., Griffith, M., Mlynarz, A., Kwok, Y.C., and Yang, D.S.C. (1995)** Antifreeze Proteins in Winter Rye Are Similar to Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiology* **109**: 879-889.
- Horvath, D.M. and Chua, N.H. (1996)** Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Molecular Biology* **31**: 1061-1072.
- Howe, G.A., Lightner, J., Browse, J., and Ryan, C.A. (1996)** An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* **8**: 2067-2077.
- Howe, G.A. (2004)** Jasmonates as signals in the wound response. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**: 223-237.
- Hu, X., Bidney, D.L., Yalpani, N., Duvick, J.P., Crasta, O., Folkerts, O., and Lu, G.H. (2003)** Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology* **133**: 170-181.
- Hua, J. and Meyerowitz, E.M. (1998)** Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94** : 261-271.
- Iglesias, V.A. and Meins, F. (2000)** Movement of plant viruses is delayed in a beta-1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *Plant Journal* **21**: 157-166.
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., and Faoro, F. (2004)** Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to Botrytis cinerea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 4406-4413.
- Iwata, H., Iwase, S., Takahama, K., Matuura, H., Itani, T., and Aramaki, I. (2001)** Relationship between alpha-glucosidase activity and physical and chemical properties of rice. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **48**: 482-490.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1997)** Elicitor-stimulated ion fluxes and O-2(-) from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene

activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 4800-4805.

Jacobs,A.K., Lipka,V., Burton,R.A., Panstruga,R., Strizhov,N., Schulze-Lefert,P., and Fincher,G.B. (2003) An Arabidopsis callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. *Plant Cell* **15**:2503-2513.

Jakab,G., Cottier,V., Toquin,V., Rigoli,G., Zimmerli,L., Metraux,J.P., and Mauch-Mani,B. (2001) beta-Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* **107**:29-37.

Janisiewicz,W., Yourman,L., Roitman,J., and Mahoney,N. (1991) Postharvest Control of Blue Mold and Gray Mold of Apples and Pears by Dip Treatment with Pyrrolnitrin, A Metabolite of Pseudomonas-Cepacia. *Plant Disease* **75** :490-494.

Janisiewicz,W.J. and Marchi,A. (1992) Control of Storage Rots on Various Pear Cultivars with A Saprophytic Strain of Pseudomonas-Syringae. *Plant Disease* **76**:555-560.

Janisiewicz,W.J. and Bors,B. (1995) Development of A Microbial Community of Bacterial and Yeast Antagonists to Control Wound-Invading Postharvest Pathogens of Fruits. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:3261-3267.

Janisiewicz,W.J. and Jeffers,S.N. (1997) Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection* **16**:629-633.

Jewell,S.N., Waldo,R.H., Cain,C.C., and Falkinham,J.O. (2002) Rapid detection of lytic antimicrobial activity against yeast and filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* **49**:1-9.

Jimenez-Martinez,E.S., Bosque-Perez,N.A., Berger,P.H., Zemetra,R., Ding,H.J., and Eigenbrode,S.D. (2004) Volatile cues influence the response of Rhopalosiphum padi (Homoptera : Aphididae) to barley yellow dwarf virus-infected transgenic and untransformed wheat. *Environmental Entomology* **33**:1207-1216.

Jin,H.L., Liu,Y.D., Yang,K.Y., Kim,C.Y., Baker,B., and Zhang,S.Q. (2003) Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *Plant Journal* **33**:719-731.

Jirage,D., Tootle,T.L., Reuber,T.L., Frost,L.N., Feys,B.J., Parker,J.E., Ausubel,F.M., and Glazebrook,J. (1999) Arabidopsis thaliana PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:13583-13588.

Johnson,C., Boden,E., and Arias,J. (2003) Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**:1846-1858.

Jones,D.A. and Takemoto,D. (2004) Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* **16**:48-62.

Jones,J.D.G. (1996) Plant disease resistance genes: Structure, function and evolution. *Current Opinion in Biotechnology* **7**:155-160.

Jones,J.D.G. and Dangl,J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**:323-329.

- Jorda,L., Conejero,V., and Vera,P. (2000)** Characterization of P69E and P69F, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. *Plant Physiology* **122**:67-73.
- Kachroo,P., Kachroo,A., Lapchyk,L., Hildebrand,D., and Klessig,D.F. (2003)** Restoration of defective cross talk in ssi2 mutants: role of salicylic acid, jasmonic acid, and fatty acids in SSI2-mediated signaling. *Mol Plant Microbe Interact.* **16**:1022-1029.
- Kamoun,S. (2003)** Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell* **2**:191-199.
- Kapoor,R.P., Batra,H., and Sharma,P.K. (1997)** Synthesis of some oxadiazoles, thiadiazoles and triazoles of potential biological importance. *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry* **7**:1-4.
- Kariola,T., Brader,G., Li,J., and Palva,E.T. (2005)** Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *Plant Cell* **17**:282-294.
- Kars,I., Krooshof,G.H., Wagemakers,L., Joosten,R., Benen,J.A.E., and van Kan,J.A.L. (2005)** Necrotizing activity of five Botrytis cinerea endopolygalacturonases produced in Pichia pastoris. *Plant Journal* **43**:213-225.
- Katz,V.A., Thulke,O.U., and Conrath,U. (1998)** A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiology* **117**:1333-1339.
- Kauss,H., Theisingerhinkel,E., Mindermann,R., and Conrath,U. (1992)** Dichloroisonicotinic and Salicylic-Acid, Inducers of Systemic Acquired-Resistance, Enhance Fungal Elicitor Responses in Parsley Cells. *Plant Journal* **2**:655-660.
- Kawchuk,L.M., Hachey,J., Lynch,D.R., Kulcsar,F., van Rooijen,G., Waterer,D.R., Robertson,A., Kokko,E., Byers,R., Howard,R.J., Fischer,R., and Pruffer,D. (2001)** Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:6511-6515.
- Kende,H. (1993)** Ethylene Biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**:283-307.
- Kesarwani,M., Azam,M., Natarajan,K., Mehta,A., and Datta,A. (2000)** Oxalate decarboxylase from Collybia velutipes - Molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. *Journal of Biological Chemistry* **275**:7230-7238.
- Kessler,A., Halitschke,R., Diezel,C., and Baldwin,I.T. (2006)** Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between Artemisia tridentata and Nicotiana attenuata. *Oecologia* **148**:280-292.
- Kettner,J. and Dorffling,K. (1995)** Biosynthesis and Metabolism of Abscisic-Acid in Tomato Leaves Infected with Botrytis-Cinerea. *Planta* **196**:627-634.
- Keukens, E. A. J., T. de Vrije, C. van den Boom, P. de Waard, H. H. Plasman, F. Thiel, V. Chupin, W. M. F. Jongen, and B. de Kruijff. (1995)** Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* **1240**:216-228.
- Khokhlatchev,A.V., Canagarajah,B., Wilsbacher,J., Robinson,M., Atkinson,M., Goldsmith,E., and Cobb,M.H. (1998)** Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**:605-615.

- Kim,C.G., Power,S.A., and Bell,J.N.B. (2004)** Effects of host plant exposure to cadmium on mycorrhizal infection and soluble carbohydrate levels of *Pinus sylvestris* seedlings. *Environmental Pollution* **131**: 287-294.
- Kim,C.Y., Liu,Y.D., Thorne,E.T., Yang,H.P., Fukushige,H., Gassmann,W., Hildebrand,D., Sharp,R.E., and Zhang,S.Q. (2003)** Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell* **15**: 2707-2718.
- Kim,K.S., Min,J.Y., and Dickman,M.B. (2008)** Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 605-612.
- Kim,Y.J., Lin,N.C., and Martin,G.B. (2002)** Two distinct pseudomonas effector proteins 589 interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell* **109**: 589-598.
- Kinderlerer,J.L. and Hatton,P.V. (1990)** Fungal Metabolites of Sorbic Acid. *Food Additives and Contaminants* **7**: 657-669.
- Kinkema,M., Fan,W.H., and Dong,X.N. (2000)** Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* **12**: 2339-2350.
- Kishimoto,K., Matsui,K., Ozawa,R., and Takabayashi,J. (2005)** Volatile C6-aldehydes and allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **46**: 1093-1102.
- Kishimoto,K., Matsui,K., Wawa,R., and Takabayashi,J. (2006)** Components of C6-aldehyde-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against a necrotrophic fungal pathogen, *Botrytis cinerea*. *Plant Science* **170**: 715-723.
- Klarzynski,O., Plesse,B., Joubert,J.M., Yvin,J.C., Kopp,M., Kloareg,B., and Fritig,B. (2000)** Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology* **124**: 1027-1037.
- Klee,H.J., Hayford,M.B., Kretzmer,K.A., Barry,G.F., and Kishore,G.M. (1991)** Control of Ethylene Synthesis by Expression of A Bacterial Enzyme in Transgenic Tomato Plants. *Plant Cell* **3**: 1187-1193.
- Knight,S.C., Anthony,V.M., Brady,A.M., Greenland,A.J., Heaney,S.P., Murray,D.C., Powell,K.A., Schulz,M.A., Spinks,C.A., Worthington,P.A., and Youle,D. (1997)** Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annual Review of Phytopathology* **35**: 349-372.
- Knight,V.I., Wang,H., Lincoln,J.E., Lulai,E.C., Gilchrist,D.G., and Bostock,R.M. (2001)** Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**: 277-286.
- Knoester,M., van Loon,L.C., van den,H.J., Hennig,J., Bol,J.F., and Linthorst,H.J. (1998)** Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 1933-1937.
- Knogge,W. (1996)** Fungal infection of plants. *Plant Cell* **8**: 1711-1722.
- Koch E, Slusarenko A. (1990)** *Arabidopsis* is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell* **2**: 437-45.
- Kodama,O., Miyakawa,J., Akatsuka,T., and Kiyosawa,S. (1992)** Sakuranetin, A Flavanone Phytoalexin from Ultraviolet-Irradiated Rice Leaves. *Phytochemistry* **31**: 3807-3809.

- Koga,H., Dohi,K., and Mori,M. (2004)** Abscisic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection of Magnaporthe grisea. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**: 3-9.
- Kohler,A., Schwindling,S., and Conrath,U. (2002)** Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiology* **128**:1046-1056.
- Kohm,B.A., Goulden,M.G., Gilbert,J.E., Kavanagh,T.A., and Baulcombe,D.C. (1993)** A Potato Virus-X Resistance Gene Mediates An Induced, Nonspecific Resistance in Protoplasts. *Plant Cell* **5**:913-920.
- Kost,C. and Heil,M. (2005)** Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus.*, Fabaceae). *Basic and Applied Ecology* **6**:237-248.
- Kotchoni,S.O. and Gachomo,E.W. (2006)** The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *Journal of Biosciences* **31** :389-404.
- Kovtun,Y., Chiu,W.L., Tena,G., and Sheen,J. (2000)** Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 2940-2945.
- Kramer M, Sanders R, Bolkan H, Waters C, Sheey RE, Hiatt WR. (1992)** Postharvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance. *Postharvest Biology and Technology* **1**: 241–255.
- Kreps,J.A., Wu,Y.J., Chang,H.S., Zhu,T., Wang,X., and Harper,J.F. (2002)** Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* **130**:2129-2141.
- Krips,O.E., Willems,P.E.L., Gols,R., Posthumus,M.A., Gort,G., and Dicke,M. (2001)** Comparison of cultivars of ornamental crop *Gerbera jamesonii* on production of spider mite-induced volatiles, and their attractiveness to the predator *Phytoseiulus persimilis*. *Journal of Chemical Ecology* **27**:1355-1372.
- Krishna,P. (2003)** Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**:289-297.
- Kruger,J., Thomas,C.M., Golstein,C., Dixon,M.S., Smoker,M., Tang,S.K., Mulder,L., and Jones,J.D.G. (2002)a** A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science* **296**:744-747.
- Kruger,W.M., Carver,T.L.W., and Zeyen,R.J. (2002)b** Effects of inhibiting phenolic biosynthesis on penetration resistance of barley isolines containing seven powdery mildew resistance genes or alleles. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**:41-51.
- Kubo,I., Muroi,H., and Kubo,A. (1995)** Structural Functions of Antimicrobial Long-Chain Alcohols and Phenols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **3**:873-880.
- Kuc,J. (1982)** Induced Immunity to Plant-Disease. *Bioscience* **32**:854-860.
- Kumar,D. and Klessig,D.F. (2003)** High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:16101-16106.

Kunkel BN, Agnew J, Collins JJ, Cohen J, Chen Z: Molecular Genetic Analysis of AvrRpt2 (2004) Activity in Promoting Virulence of *Pseudomonas syringae*. In *Genomic and Genetic Analysis of Plant Parasitism and Defense*. Edited by Tsuyumu S, Leach J, Shiraishi T, Wolpert T. Saint Paul, MN: The American Phytopathological Society Press: 92-102.

Kunkel,B.N., Bent,A.F., Dahlbeck,D., Innes,R.W., and Staskawicz,B.J. (1993) Rps2, An Arabidopsis Disease Resistance Locus Specifying Recognition of *Pseudomonas-Syringae* Strains Expressing the Avirulence Gene AvrRpt2. *Plant Cell* **5**: 865-875.

Kunkel,B.N. and Brooks,D.M. (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 325-331.

Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., Felix, G. (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis. *The EMBO journal* **22**: 2623-2633.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.

Lamb,C.J., Ryals,J.A., Ward,E.R., and Dixon,R.A. (1992) Emerging Strategies for Enhancing Crop Resistance to Microbial Pathogens. *Bio-Technology* **10**: 1436-1445.

LaMondia,J.A. and Douglas,S.M. (1997) Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* **81**: 729-732.

Langcake,P. and Pryce,R.J. (1976) Production of Resveratrol by *Vitis-Vinifera* and Other Members of Vitaceae As A Response to Infection Or Injury. *Physiological Plant Pathology* **9**: 77-86.

Langcake,P. (1981) Disease Resistance of *Vitis Spp* and the Production of the Stress Metabolites Resveratrol, Epsilon-Viniferin, Alpha-Viniferin and Pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* **18**: 213-226.

Larrigaudiere,C., Pons,J., Torres,R., and Usall,J. (2002) Storage performance of clementines treated with hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate dips. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **77**: 314-319.

Lashbrook,C.C., Gonzalezbosch,C., and Bennett,A.B. (1994) 2 Divergent Endo-Beta-1,4-Glucanase Genes Exhibit Overlapping Expression in Ripening Fruit and Abscising Flowers. *Plant Cell* **6**: 1485-1493.

Lashbrook,C.C., Giovannoni,J.J., Hall,B.D., Fischer,R.L., and Bennett,A.B. (1998) Transgenic analysis of tomato endo-beta-1,4-glucanase gene function. Role of cel1 in floral abscission. *Plant Journal* **13**: 303-310.

Latorre,B.A., Flores,V., Sara,A.M., and Roco,A. (1994) Dicarboximide-Resistant Isolates of *Botrytis-Cinerea* from Table Grape in Chile - Survey and Characterization. *Plant Disease* **78**: 990-994.

Lattanzio V, De Cicco D, Di Venere, D Lima G, Salerno M. (1994) Antifungal activity of phenolics against fungi comonly encountered during storage. *Ital J Food Sci* **6**: 23–30

Lawton,K., Weymann,K., Friedrich,L., Vernooij,B., Uknes,S., and Ryals,J. (1995) Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 863-870.

- Lawton,K.A., Potter,S.L., Uknes,S., and Ryals,J. (1994)** Acquired-Resistance Signal-Transduction in Arabidopsis Is Ethylene Independent. *Plant Cell* **6**:581-588.
- Lay,F.T. and Anderson,M.A. (2005)** Defensins - Components of the innate immune system in plants. *Current Protein & Peptide Science* **6**:85-101.
- Lebel,E., Heifetz,P., Thorne,L., Uknes,S., Ryals,J., and Ward,E. (1998)** Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *Plant Journal* **16**:223-233.
- Lee,H.J., Choi,G.J., and Cho,K.Y. (1998)** Correlation of lipid peroxidation in Botrytis cinerea caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 737-741.
- Lee, S.-W., Ahn, I.-P., Lim, J.-W., and Lee, Y.-H. (2005)** Pseudomonas putida strain 17 isolated from replant soil promotes plant growth and strain 17 isolated from replant soil promotes plant growth and inhibits conidial germination of soilborne plant pathogens. *Plant Pathol. J.* **21**: 244-251.
- Leister,R.T. and Katagiri,F. (2000)** A resistance gene product of the nucleotide binding site - leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins in vivo. *Plant Journal* **22**: 345-354.
- Leon,J., Shulaev,V., Yalpani,N., Lawton,M.A., and Raskin,I. (1995)** Benzoic-Acid 2-Hydroxylase, A Soluble Oxygenase from Tobacco, Catalyzes Salicylic-Acid Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 10413-10417.
- Leon,J., Rojo,E., and Sanchez-Serrano,J.J. (2001)** Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1-9.
- Leroux,P. (1991)** Similarity Between the Antifungal Activities of Fenpiclonil, Iprodione and Tolclofos-Methyl. *Agronomie* **11**:115-117.
- Leroux,P., Lanen,C., and Fritz,R. (1992)** Similarities in the Antifungal Activities of Fenpiclonil, Iprodione and Tolclofos-Methyl Against Botrytis-Cinerea and Fusarium-Nivale. *Pesticide Science* **36**:255-261.
- Leroux,P. (1996)** Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pesticide Science* **47**:191-197.
- Leroux,P., Arnold,A., Chapeland,F., and Gredt,M. (1998)** Resistance de *Botrytis cinerea* aux fungicides.Du laboratoire au vignoble et viceversa. *Phytoma* **504**:62-64.
- Leroux,P., Chapeland,F., Desbrosses,D., and Gredt,M. (1999)** Patterns of cross-resistance to fungicides in Botryotinia fuckeliana (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* **18**:687-697.
- Leroux,P., Fritz,R., Debieu,D., Albertini,C., Lanen,C., Bach,J., Gredt,M., and Chapeland,F. (2002)** Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of Botrytis cinerea. *Pest Management Science* **58**:876-888.
- Leskovar,D.I. and Kolenda,K. (2002)** Strobilurin plus acibenzolar-S-methyl controls white rust without inducing leaf chlorosis in spinach. *Annals of Applied Biology* **140**: 171-175.
- Leyman,B., Geelen,D., Quintero,F.J., and Blatt,M.R. (1999)** A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels. *Science* **283**:537-540.

- Li,C.Y., Williams,M.M., Loh,Y.T., Lee,G.I., and Howe,G.A. (2002)** Resistance of cultivated tomato to cell content-feeding herbivores is regulated by the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiology* **130**:494-503.
- Li,C.Y., Schillmiller,A.L., Liu,G.H., Lee,G.I., Jayanty,S., Sageman,C., Vrebalov,J., Giovannoni,J.J., Yagi,K., Kobayashi,Y., and Howe,G.A. (2005)** Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell* **17**:971-986.
- Li,J., Brader,G., and Palva,E.T. (2004)** The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* **16**:319-331.
- Li,L., Li,C., and Howe,G.A. (2001)** Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. *Plant Physiol* **127**:1414-1417.
- Li,X., Zhang,Y.L., Clarke,J.D., Li,Y., and Dong,X.N. (1999)** Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNII1, through a screen for suppressors of npr1-1. *Cell* **98**:329-339.
- Liang,H.Y., Maynard,C.A., Allen,R.D., and Powell,W.A. (2001)** Increased Septoria musiva resistance in transgenic hybrid poplar leaves expressing a wheat oxalate oxidase gene. *Plant Molecular Biology* **45**:619-629.
- Libertini,E., Li,Y., and Queen-Mason,S.J. (2004)** Phylogenetic analysis of the plant endo-beta-1,4-glucanase gene family. *Journal of Molecular Evolution* **58**:506-515.
- Lin,M.H., Morshedi,M., Srisombut,C., Nassar,A., and Oehninger,S. (1998)** Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining. *Fertility and Sterility* **70**:1148-1155.
- Lionetti,V., Raiola,A., Camardella,L., Giovane,A., Obel,N., Pauly,M., Favaron,F., Cervone,F., and Bellincampi,D. (2007)** Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis restricts fungal infection by Botrytis cinerea. *Plant Physiology* **143**:1871-1880.
- Lipka,V., Dittgen,J., Bednarek,P., Bhat,R., Wiermer,M., Stein,M., Landtag,J., Brandt,W., Rosahl,S., Scheel,D., Llorente,F., Molina,A., Parker,J., Somerville,S., and Schulze-Lefert,P. (2005)** Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. *Science* **310**:1180-1183.
- Liu,W.T., Chu,C.L., and Zhou,T. (2002)** Thymol and acetic acid vapors reduce postharvest brown rot of apricots and plums. *Hortscience* **37**:151-156.
- Liu,X.P., Wang,J.Y., Gou,P., Mao,C.G., Zhu,Z.R., and Li,H.Y. (2007)** In vitro inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. *International Journal of Food Microbiology* **119**:223-229.
- Liu,Y.D. and Zhang,S.Q. (2004)** Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**:3386-3399.
- Logi,C., Sbrana,C., and Giovannetti,M. (1998)** Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:3473-3479.
- Lohani,S., Trivedi,P.K., and Nath,P. (2004)** Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and Technology* **31**:119-126.

- Lopez-Huertas,E., Charlton,W.L., Johnson,B., Graham,I.A., and Baker,A. (2000)** Stress induces peroxisome biogenesis genes. *Embo Journal* **19**:6770-6777.
- Lorenzo,O., Piqueras,R., Sanchez-Serrano,J.J., and Solano,R. (2003)b** Ethylene Response Factor1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *Plant Cell* **15**:165-178.
- Lorenzo,O., Chico,J.M., Sanchez-Serrano,J.J., and Solano,R. (2004)** Jasmonate-insensitive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**:1938-1950.
- Ludwig,A.A., Saitoh,H., Felix,G., Freymark,G., Miersch,O., Wasternack,C., Boller,T., Jones,J.D.G., and Romeis,T. (2005)** Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:10736-10741.
- Lund,S.T., Stall,R.E., and Klee,H.J. (1998)** Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* **10**:371-382.
- Lyon,G.D., Reglinski,T., and Newton,A.C. (1995)** Novel Disease-Control Compounds - the Potential to Immunize Plants Against Infection. *Plant Pathology* **44**:407-427.
- Mackey,D., Belkhadir,Y., Alonso,J.M., Ecker,J.R., and Dangl,J.L. (2003)** Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**:379-389.
- Mackey,D. and Mcfall,A.J. (2006)** MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology* **61**:1365-1371.
- MacKinnon,S.L., Keifer,P., and Ayer,W.A. (1999)** Components from the phytotoxic extract of *Alternaria brassicicola*, a black spot pathogen of canola. *Phytochemistry* **51**:215-221.
- Mahmoud,S.S. and Croteau,R.B. (2002)** Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **7**:366-373.
- Maldonado,A.M., Doerner,P., Dixon,R.A., Lamb,C.J., and Cameron,R.K. (2002)** A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature* **419**:399-403.
- Malone,M. (1996)** Rapid, long-distance signal transmission in higher plants. *Advances in Botanical Research, Vol 22* **22**:163-228.
- Manandhar,H.K., Jorgensen,H.J.L., Mathur,S.B., and Smedegaard-Petersen,V. (1998)** Resistance to rice blast induced by ferric chloride, di-potassium hydrogen phosphate and salicylic acid. *Crop Protection* **17**:323-329.
- Manteau,S., Abouna,S., Lambert,B., and Legendre,L. (2003)** Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Fems Microbiology Ecology* **43**:359-366.
- Mari,M., Iori,R., Leoni,O., and Marchi,A. (1993)** In-Vitro Activity of Glucosinolate-Derived Isothiocyanates Against Postharvest Fruit Pathogens. *Annals of Applied Biology* **123**:155-164.
- Mari,M., Iori,R., Leoni,O., and Marchi,A. (1996)a** Bioassays of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest pear pathogens. *Plant Pathology* **45**:753-760.

- Mari,M., Guizzardi,M., Brunelli,M., and Folchi,A. (1996)b** Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* Pers:Fr) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* **15**:699-705.
- Mari,N., Guizzardi,M., and Pratella,G.C. (1996)c** Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biological Control* **7**:30-37.
- Mari,M., Leoni,O., Iori,R., and Cembali,T. (2002)** Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathology* **51**:231-236.
- Marin,E. and MarionPoll,A. (1997)** Tomato flacca mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**:369-372.
- Marois,E., Van den Ackerveken,G., and Bonas,U. (2002)** The Xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**:637-646.
- Marti,E., Gisbert,C., Bishop,G.J., Dixon,M.S., and Garcia-Martinez,J.L. (2006)** Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany* **57**:2037-2047.
- Martin,G.B., Bogdanove,A.J., and Sessa,G. (2003)** Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* **54**:23-61.
- Masner,P., Muster,P., and Schmid,J. (1994)** Possible Methionine Biosynthesis Inhibition by Pyrimidinamine Fungicides. *Pesticide Science* **42**:163-166.
- Matsui,K. (2006)** Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **9**:274-280.
- Mauch-Mani,B. and Mauch,F. (2005)** The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**:409-414.
- MauchMani,B. and Slusarenko,A.J. (1996)** Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* **8**:203-212.
- McGrath,K.C., Dombrecht,B., Manners,J.M., Schenk,P.M., Edgar,C.I., Maclean,D.J., Scheible,W.R., Udvardi,M.K., and Kazan,K. (2005)** Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiol* **139**:949-959.
- Meepagala,K.M., Sturtz,G., and Wedge,D.E. (2002)** Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:6989-6992.
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy AA. (1997)** A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal* **12**: 1465–1472.
- Mellersh,D.G., Foulds,I.V., Higgins,V.J., and Heath,M.C. (2002)** H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant Journal* **29**:257-268.
- Melotto,M., Underwood,W., Koczan,J., Nomura,K., and He,S.Y. (2006)** Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**:969-980.

- Mendoza,L., Wilkens,M., and Urzua,A. (1997)** Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean Pseudognaphalium (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* **58**:85-88.
- Mendoza,L., raya-Maturana,R., Cardona,W., gado-Castro,T., Garcia,C., Lagos,C., and Cotoras,M. (2005)** In vitro sensitivity of Botrytis cinerea to anthraquinone and anthrahydroquinone derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:10080-10084.
- Mengiste,T., Chen,X., Salmeron,J., and Dietrich,R. (2003)** The Botrytis Susceptible1 Gene Encodes An R2R3Myb Transcription Factor Protein That Is Required for Biotic and Abiotic Stress Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**:2551-2565.
- Merchan,S., Bernal,D., Serrano,R., and Yenush,L. (2004)** Response of the Saccharomyces cerevisiae Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryotic Cell* **3**:100-107.
- Metraux,J.P., Nawrath,C., and Genoud,T. (2002)** Systemic acquired resistance. *Euphytica* **124**:237-243.
- Micheli,F. (2001)** Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* **6**:414-419.
- Michelmore,R. (2000)** Genomic approaches to plant disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **3**:125-131.
- Mihaliak,C.A., Gershenzon,J., and Croteau,R. (1991)** Lack of Rapid Monoterpene Turnover in Rooted Plants - Implications for Theories of Plant-Chemical Defense. *Oecologia* **87**:373-376.
- Milligan,S.B. and Gasser,C.S. (1995)** Nature and Regulation of Pistil-Expressed Genes in Tomato. *Plant Molecular Biology* **28**:691-711.
- Milling,R.J. and Richardson,C.J. (1995)** Mode of Action of the Anilino-Pyrimidine Fungicide Pyrimethanil .2. Effects on Enzyme-Secretion in Botrytis-Cinerea. *Pesticide Science* **45**:43-48.
- Mitchell,A.F. and Walters,D.R. (2004)** Potassium phosphate induces systemic protection in barley to powdery mildew infection. *Pest Management Science* **60**:126-134.
- Mittler,R. (2002)** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**:405-410.
- Miura,I., Kamakura,T., Maeno,S., Hayashi,S., and Yamaguchi,I. (1994)** Inhibition of Enzyme-Secretion in Plant-Pathogens by Mepanipyrim, A Novel Fungicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **48**:222-228.
- Moeder,W., Barry,C.S., Tauriainen,A.A., Betz,C., Tuomainen,J., Utriainen,M., Grierson,D., Sandermann,H., Langebartels,C., and Kangasjarvi,J. (2002)** Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiology* **130**:1918-1926.
- Mohr,P.G. and Cahill,D.M. (2003)** Abscisic acid influences the susceptibility of Arabidopsis thaliana to Pseudomonas syringae pv. tomato and Peronospora parasitica. *Functional Plant Biology* **30**:461-469.
- Mohr,P.G. and Cahill,D.M. (2007)** Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in Arabidopsis infected with Pseudomonas syringae pv. tomato. *Functional & Integrative Genomics* **7**:181-191.

Moline, H.E., Buta, J.G., Saftner, R.A., Maas, J.L. (1997) Comparison of three volatile natural products for the reduction of post-harvest decay in strawberries. *Adv. Straw. Res.* **16**: 13–18.

Montero, C., Cristescu, S.M., Jimenez, J.B., Orea, J.M., Hekkert, S.T.L., Harren, F.J.M., and Urena, A.G. (2003) trans-resveratrol and grape disease resistance. A dynamical study by high-resolution laser-based techniques. *Plant Physiology* **131**: 129-138.

Montesinos, E. (2003) Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology* **6**: 245-252.

Montoya, T., Nomura, T., Farrar, K., Kaneta, T., Yokota, T., and Bishop, G.J. (2002) Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *Plant Cell* **14**: 3163-3176.

Mou, Z., Fan, W.H., and Dong, X.N. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935-944.

Mucharromah, E. and Kuc, J. (1991) Oxalate and Phosphates Induce Systemic Resistance Against Diseases Caused by Fungi, Bacteria and Viruses in Cucumber. *Crop Protection* **10**: 265-270.

Muckenschnabel, I., Goodman, B.A., Williamson, B., Lyon, G.D., and Deighton, N. (2002) Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *Journal of Experimental Botany* **53**: 207-214.

Muñoz, A., Lopez-Garcia, B., Perez-Paya, E., and Marcos, J.F. (2007) Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**: 172-177.

Mur, L.A.J., Naylor, G., Warner, S.A.J., Sugars, J.M., White, R.F., and Draper, J. (1996) Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant Journal* **9**: 559-571.

Murphy, A.M., PryceJones, E., Johnstone, K., and Ashby, A.M. (1997) Comparison of cytokinin production in vitro by *Pyrenopeziza brassicae* with other plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**: 53-65.

Muskett, P. and Parker, J. (2003) Role of SGT1 in the regulation of plant R gene signalling. *Microbes and Infection* **5**: 969-976.

Nakagami, H., Pitzschke, A., and Hirt, H. (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* **10**: 339-346.

Nakashita, H., Yasuda, M., Nishioka, M., Hasegawa, S., Arai, Y., Uramoto, M., Yoshida, S., and Yamaguchi, I. (2002)a Chloroisonicotinamide derivative induces a broad range of disease resistance in rice and tobacco. *Plant and Cell Physiology* **43**: 823-831.

Nakashita, H. (2002) Chemically induced disease resistance in plants. *Journal of Pesticide Science* **27**: 401-403.

Nakashita, H., Yoshioka, K., Yasuda, M., Nitta, T., Arai, Y., Yoshida, S., and Yamaguchi, I. (2002)b Probenazole induces systemic acquired resistance in tobacco through salicylic acid accumulation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**: 197-203.

Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., and Yoshida, S. (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant Journal* **33**: 887-898.

- Nakatsuka,A., Murachi,S., Okunishi,H., Shiomi,S., Nakano,R., Kubo,Y., and Inaba,A. (1998)** Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiology* **118**:1295-1305.
- Nandi,A., Welti,R., and Shah,J. (2004)** The Arabidopsis thaliana dihydroxyacetone phosphate reductase gene SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1 is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **16**:465-477.
- Navarro,L., Dunoyer,P., Jay,F., Arnold,B., Dharmasiri,N., Estelle,M., Voinnet,O., and Jones,J.D.G. (2006)** A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**:436-439.
- Navarro,L., Bari,R., Achard,P., Lison,P., Nemri,A., Harberd,N.P., and Jones,J.D.G. (2008)** DELLAs control plant immune responses by modulating the balance and salicylic acid signaling. *Current Biology* **18**:650-655.
- Nawrath,C. and Metraux,J.P. (1999)** Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**:1393-1404.
- Nawrath,C., Heck,S., Parinthewong,N., and Metraux,J.P. (2002)** EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* **14**:275-286.
- Newton,A.C. and Young,I.M. (1996)** Temporary partial breakdown of Mlo-resistance in spring barley by the sudden relief of soil water stress. *Plant Pathology* **45**:973-977.
- Niderman,T., Genetet,I., Bruyere,T., Gees,R., Stintzi,A., Legrand,M., Fritig,B., and Mosinger,E. (1995)** Pathogenesis-Related Pr-1 Proteins Are Antifungal - Isolation and Characterization of 3 14-Kilodalton Proteins of Tomato and of A Basic Pr-1 of Tobacco with Inhibitory Activity Against Phytophthora-Infestans. *Plant Physiology* **108**:17-27.
- Nie,X.Z., Singh,R.P., and Tai,G.C.C. (2002)** Molecular characterization and expression analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs from potato under abiotic and biotic stresses. *Genome* **45**:905-913.
- Nihei,K., Nihei,A., and Kubo,I. (2003)** Rational design of antimicrobial agents: Antifungal activity of alk(en)yl dihydroxybenzoates and dihydroxyphenyl alkanoates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **13**:3993-3996.
- Niki,T., Mitsuhashi,I., Seo,S., Ohtsubo,N., and Ohashi,Y. (1998)** Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology* **39**:500-507.
- Nishimura,M. and Somerville,S. (2002)** Plant biology - Resisting attack. *Science* **295**:2032-2033.
- Nishimura,M.T., Stein,M., Hou,B.H., Vogel,J.P., Edwards,H., and Somerville,S.C. (2003)** Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* **301**:969-972.
- Norman-Setterblad,C., Vidal,S., and Palva,E.T. (2000)** Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from Erwinia carotovora. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**:430-438.

- Nothnagel, E.A., Mcneil, M., Albersheim, P., and Dell, A. (1983)** Host-Pathogen Interactions .22. A Galacturonic Acid Oligosaccharide from Plant-Cell Walls Elicits Phytoalexins. *Plant Physiology* **71**: 916-926.
- Nuhse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H., and Boller, T. (2000)** Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 7521-7526.
- Nurnberger, T. and Brunner, F. (2002)** Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 318-324.
- Nursten, H.E. and Ward, A.G. (1970)** Quantification of Food Quality Assessment. *Community Health* **1**: 215-224.
- O'Donnell, P.J., Jones, J.B., Antoine, F.R., Ciardi, J., and Klee, H.J. (2001)** Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant Journal* **25**: 315-323.
- O'Donnell, P.J., Schmelz, E.A., Moussatche, P., Lund, S.T., Jones, J.B., and Klee, H.J. (2003)** Susceptible to intolerance - a range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. *Plant Journal* **33**: 245-257.
- Obara, N., Hasegawa, M., and Kodama, O. (2002)** Induced volatiles in elicitor-treated and rice blast fungus-inoculated rice leaves. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **66**: 2549-2559.
- Ochiai, M., Ubagai, T., Kawamori, T., Imai, H., Sugimura, T., and Nakagama, H. (2001)** High susceptibility of Scid mice to colon carcinogenesis induced by azoxymethane indicates a possible caretaker role for DNA-dependent protein kinase. *Carcinogenesis* **22**: 1551-1555.
- Oerke, E.C., Krone, C., Jacobi, I., and Schonbeck, F. (1992)** Relations Between Stress-Induced Modifications of the Pathogenesis of Erysiphe-Graminis-Hordei and the Membrane-Components of Barley. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* **134**: 157-169.
- Oh, I.S., Park, A.R., Bae, M.S., Kwon, S.J., Kim, Y.S., Lee, J.E., Kang, N.Y., Lee, S.M., Cheong, H., and Park, O.K. (2005)** Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against Alternaria brassicicola. *Plant Cell* **17**: 2832-2847.
- Ohmiya, Y., Samejima, M., Shiroishi, M., Amano, Y., Kanda, T., Sakai, F., and Hayashi, T. (2000)** Evidence that endo-1,4-beta-glucanases act on cellulose in suspension-cultured poplar cells. *Plant Journal* **24**: 147-158.
- Oldroyd, G.E.D. and Staskawicz, B.J. (1998)** Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 10300-10305.
- Ongena, M., Duby, F., Rossignol, F., Fauconnier, M.L., Dommes, J., and Thonart, P. (2004)** Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic Pseudomonas strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 1009-1018.
- Oosterhaven, K., Hartmans, K.J., Scheffer, J.J.C., and Vanderplas, L.H.W. (1995)** Inhibitory Effect of S-Carvone on Wound-Healing of Potato-Tuber Tissue. *Physiologia Plantarum* **93**: 225-232.
- Oosterhaven, K., Hartmans, K.J., and Scheffer, J.J.C. (1995)** Inhibition of Potato Sprout Growth by Carvone Enantiomers and Their Bioconversion in Sprouts. *Potato Research* **38**: 219-230.

- Oosterhaven,K., Hartmans,K.J., Scheffer,J.J.C., and Vanderplas,H.W. (1995)** S-Carvone Inhibits Phenylalanine Ammonia-Lyase (Pal) Activity and Suberization During Wound-Healing of Potato-Tubers. *Journal of Plant Physiology* **146**: 288-294.
- Orober,M., Siegrist,J., and Buchenauer,H. (2002)** Mechanisms of phosphate-induced disease resistance in cucumber. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 345-353.
- Osborn,A. (1996)** Saponins and plant defence - A soap story. *Trends in Plant Science* **1**: 4-9.
- Osborn,A.E. (1996)** Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831.
- Oshima,M., Fujimura,M., Banno,S., Hashimoto,C., Motoyama,T., Ichiishi,A., and Yamaguchi,I. (2002)** A point mutation in the two-component histidine kinase BcOS-1 gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **92**: 75-80.
- Ozawa,R., Arimura,G., Takabayashi,J., Shimoda,T., and Nishioka,T. (2000)** Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant and Cell Physiology* **41**: 391-398.
- Ozcan,M. (1999)** Antifungal properties of propolis. *Grasas y Aceites* **50**: 395-398.
- Padmanabhan,M.S., Gorepoker,S.P., Golem,S., Shiferaw,H., and Culver,J.N. (2005)a** Interaction of the tobacco mosaic virus replicase protein with the Aux/IAA protein PAPI/IAA26 is associated with disease development. *Journal of Virology* **79**: 2549-2558.
- Padmanabhan,M.S., Shiferaw,H., and Culver,J.N. (2005)b** Tobamovirus interference in auxin response: A pathway to disease. *Phytopathology* **95**: S135.
- Padmanabhan,M.S., Shiferaw,H., and Culver,J.N. (2006)** The Tobacco mosaic virus replicase protein disrupts the localization and function of interacting Aux/IAA proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 864-873.
- Palou,L., Usall,J., Smilanick,J.L., Aguilar,M.J., and Vinas,I. (2002)** Evaluation of food additives and low-toxicity compounds as alternative chemicals for the control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruit. *Pest Management Science* **58**: 459-466.
- Panter, S.N. and Jones, D.A. (2002)** Age-related resistance to plant pathogens. *Adv. Bot. Res.* **38**: 251-280.
- Pare,P.W. and Tumlinson,J.H. (1997)** De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiology* **114**: 1161-1167.
- Pare,P.W., Farag,M.A., Krishnamachari,V., Zhang,H.M., Ryu,C.M., and Kloepper,J.W. (2005)** Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. *Photosynthesis Research* **85**: 149-159.
- Passardi,F., Penel,C., and Dunand,C. (2004)** Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* **9**: 534-540.
- Paul,B., Masih,I., Deopujari,J., and Charpentier,C. (1999)** Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. *Journal of Ethnopharmacology* **68**: 71-76.

- Pearce,A.K., Booth,I.R., and Brown,A.J.P. (2001)** Genetic manipulation of 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 2,6-bisphosphate levels affects the extent to which benzoic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology-Uk* **147**: 403-410.
- Pearce,G., Marchand,P.A., Griswold,J., Lewis,N.G., and Ryan,C.A. (1998)** Accumulation of feruloyltyramine and p-coumaroyltyramine in tomato leaves in response to wounding. *Phytochemistry* **47**: 659-664.
- Penacortes,H., Albrecht,T., Prat,S., Weiler,E.W., and Willmitzer,L. (1993)** Aspirin Prevents Wound-Induced Gene-Expression in Tomato Leaves by Blocking Jasmonic Acid Biosynthesis. *Planta* **191**: 123-128.
- Penninckx,I.A.M.A., Eggermont,K., Terras,F.R.G., Thomma,B.P.H.J., DeSamblanx,G.W., Buchala,A., Metraux,J.P., Manners,J.M., and Broekaert,W.F. (1996)** Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**: 2309-2323.
- Penninckx,I.A.M.A., Thomma,B.P.H.J., Buchala,A., Metraux,J.P., and Broekaert,W.F. (1998)** Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 2103-2113.
- Penuelas,J. and Llusia,J. (2004)** Plant VOC emissions: making use of the unavoidable. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 402-404.
- Petersen,M., Brodersen,P., Naested,H., Andreasson,E., Lindhart,U., Johansen,B., Nielsen,H.B., Lacy,M., Austin,M.J., Parker,J.E., Sharma,S.B., Klessig,D.F., Martienssen,R., Mattsson,O., Jensen,A.B., and Mundy,J. (2000)** Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111-1120.
- Pichersky,E. and Gershenzon,J. (2002)** The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 237-243.
- Piedras,P., Hammond-Kosack,K.E., Harrison,K., and Jones,J.D.G. (1998)** Rapid, Cf-9- and Avr9-dependent production of active oxygen species in tobacco suspension cultures. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 1155-1166.
- Pieterse,C.M., van Wees,S.C., Van Pelt,J.A., Knoester,M., Laan,R., Gerrits,H., Weisbeek,P.J., and van Loon,L.C. (1998)** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 1571-1580.
- Pieterse,C.M. and Van Loon,L. (2004)** NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 456-464.
- Pieterse,C.M.J., vanWees,S.C.M., Hoffland,E., vanPelt,J.A., and vanLoon,L.C. (1996)** Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**: 1225-1237.
- Pieterse,C.M.J. and van Loon,L.C. (1999)** Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* **4**: 52-58.
- Pieterse,C.M.J., Van Wees,S.C.M., Ton,J., Van Pelt,J.A., and van Loon,L.C. (2002)** Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis thaliana. *Plant Biology* **4**: 535-544.
- Pilling,E. and Hofte,H. (2003)** Feedback from the wall. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 611-616.

- Piper, P., Calderon, C.O., Hatzixanthis, K., and Mollapour, M. (2001)** Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology-Sgm* **147**: 2635-2642.
- Pollastro, S., Faretra, F., DiCanio, V., and DeGuido, A. (1996)** Characterization and genetic analysis of field isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 607-613.
- Pontzen, R. and Scheinpflug, H. (1989)** Effects of Triazole Fungicides on Sterol Biosynthesis During Spore Germination of *Botrytis-Cinerea*, *Venturia-Inaequalis* and *Puccinia-Graminis F-Sp Tritici*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **95**: 151-160.
- Powell, A.L.T., van Kan, J., ten Have, A., Visser, J., Greve, L.C., Bennett, A.B., and Labavitch, J.M. (2000)** Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 942-950.
- Pozo, M.J., zcon-Aguilar, C., Dumas-Gaudot, E., and Barea, J.M. (1999)** beta-1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Science* **141**: 149-157.
- Pozo, M.J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J.M., and zcon-Aguilar, C. (2002)** Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 525-534.
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M.J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerre-Tugaye, M.T., Rosahl, S., Castresana, C., Hamberg, M., and Fournier, J. (2005)** Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiology* **139**: 1902-1913.
- Punja ZK. (2004)** Fungal Disease Resistance in Plants. Food Products Press, Binghamton, NY
- Quidde, T., Osbourn, A.E., and Tudzynski, P. (1998)** Detoxification of alpha-tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**: 151-165.
- Quirino, B.F., Noh, Y.S., Himmelblau, E., and Amasino, R.M. (2000)** Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* **5**: 278-282.
- Radha, R., Mohan, M.S.S. and Anand, A. (1999)** Antifungal properties of crude extracts of *Syzygium travancoricum*. *J. Med. Aromatic Plant Sci.* **21**: 55-56.
- Rama-Rao, A.V., Ravichandran, K., David, S.B., Ranade, S. (1985)** Menadione sodiumbisulphite : a promising plant growth regulator. *Plant Growth Reg.* **3**: 111-118.
- Ramonell, K.M., Zhang, B., Ewing, R.M., Chen, Y., Xu, D., Stacey, G., and Somerville, S. (2002)** Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **3**: 301-311.
- Rana, B.K., Taneja, V., and Singh, U.P. (1999)** Antifungal activity of an aqueous extract of leaves of garlic creeper (*Adenoclymma alliaceum* Miers.). *Pharmaceutical Biology* **37**: 13-16.
- Real, M.D., Company, P., Garcia-Agustin, P., Bennett, A.B., and Gonzalez-Bosch, C. (2004)** Characterization of tomato endo-beta-1,4-glucanase Cel1 protein in fruit during ripening and after fungal infection. *Planta* **220**: 80-86.

- Reino, J.L., Hernandez-Galan, R., Duran-Patron, R., and Collado, I.G. (2004)** Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* **152**:563-566.
- Repka, V. (2001)** Elicitor-stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. *Biologia Plantarum* **44**:555-565.
- Reuber, T.L., Plotnikova, J.M., Dewdney, J., Rogers, E.E., Wood, W., and Ausubel, F.M. (1998)** Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. *Plant Journal* **16**:473-485.
- Reuveni, R., Dor, G., Raviv, M., Reuveni, M., and Tuzun, S. (2000)** Systemic resistance against *Sphaerotheca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponics system, and its control by foliar spray of mono-potassium phosphate. *Crop Protection* **19**:355-361.
- Rewal, N., Coleysmith, J.R., and Sealylewis, H.M. (1991)** Studies on Resistance to Dichlofluanid and Other Fungicides in *Botrytis-Cinerea*. *Plant Pathology* **40**:554-560.
- Reymond, P. and Farmer, E.E. (1998)** Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**:404-411.
- Rezzonico, E., Flury, N., Meins, F., and Beffa, R. (1998)** Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related beta-1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. *Plant Physiology* **117**:585-592.
- Ribnicky, D.M., Shulaev, V., and Raskin, I. (1998)** Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* **118**:565-572.
- Rick, C.M. and Butler, L. (1956)** Cytogenetics of the Tomato. *Advances in Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine* **8**:267-382.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., and Mohnen, D.A. (2001)** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**:929-967.
- Rivas, S. and Thomas, C.M. (2005)** Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annual Review of Phytopathology* **43**:395-436.
- Rivera-Carriles, K., Argai, A., Palou, E., and Lopez-Malo, A. (2005)** Synergistic inhibitory effect of citral with selected phenolics against *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of Food Protection* **68**:602-606.
- Robatzek, S. and Somssich, I.E. (2002)** Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes & Development* **16** :1139-1149.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., and Jones, J.D. (2007)** Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* **10** :372-379.
- Robinette, D. and Matthyse, A.G. (1990)** Inhibition by *Agrobacterium-Tumefaciens* and *Pseudomonas-Savastanoi* of Development of the Hypersensitive Response Elicited by *Pseudomonas-Syringae* Pv *Phaseolicola*. *Journal of Bacteriology* **172**:5742-5749.
- Robison, M.M., Griffith, M., Pauls, K.P., and Glick, B.R. (2001)** Dual role for ethylene in susceptibility of tomato to *Verticillium* wilt. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* **149**:385-388.
- Rodriguez, F.I., Esch, J.J., Hall, A.E., Binder, B.M., Schaller, G.E., and Bleecker, A.B. (1999)** A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* **283**:996-998.

- Roetschi,A., Si-Ammour,A., Belbahri,L., Mauch,F., and Mauch-Mani,B. (2001)** Characterization of an Arabidopsis-Phytophthora pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant Journal* **28**:293-305.
- Rolke,Y., Liu,S.J., Quidde,T., Williamson,B., Schouten,A., Weltring,K.M., Siewers,V., Tenberge,K.B., Tudzynski,B., and Tudzynski,P. (2004)** Functional analysis of H₂O₂-generating systems in Botrytis cinerea: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology* **5**:17-27.
- Rolland,S., Jobic,C., Fevre,M., and Bruel,C. (2003)** Agrobacterium-mediated transformation of Botrytis cinerea, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Current Genetics* **44**:164-171.
- Romagnoli,C., Bruni,R., Andreotti,E., Rai,M.K., Vicentini,C.B., and Mares,D. (2005)** Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian Tagetes patula L. *Protoplasma* **225**:57-65.
- Rooney,H.C.E., van 't Klooster,J.W., van der Hoorn,R.A.L., Joosten,M.H.A.J., Jones,J.D.G., and De Wit,P.J.G.M. (2005)** Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**:1783-1786.
- Rose,J.K.C. and Bennett,A.B. (1999)** Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science* **4**:176-183.
- Rose,J.K.C., Ham,K.S., Darvill,A.G., and Albersheim,P. (2002)** Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: Coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell* **14**:1329-1345.
- Ross,A.F. (1961)** Systemic Acquired Resistance Induced by Localized Virus Infections in Plants. *Virology* **14**:340-&.
- Rosslénbroich,H.J. and Stuebler,D. (2000)** Botrytis cinerea - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* **19**:557-561.
- Royo,J., Vancanneyt,G., Perez,A.G., Sanz,C., Stormann,K., Rosahl,S., and SanchezSerrano,J.J. (1996)** Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *Journal of Biological Chemistry* **271**:21012-21019.
- Ruelas,C., Tiznado-Hernandez,M.E., Sanchez-Estrada,A., Robles-Burgueno,M.R., and Troncoso-Rojas,R. (2006)** Changes in phenolic acid content during Alternaria alternata infection in tomato fruit. *Journal of Phytopathology* **154**:236-244.
- Ruther,J. and Kleier,S. (2005)** Plant-plant signaling: Ethylene synergizes volatile emission in Zea mays induced by exposure to (Z)-3-Hexen-1-ol. *Journal of Chemical Ecology* **31**:2217-2222.
- Ryals,J.A., Neuenschwander,U.H., Willits,M.G., Molina,A., Steiner,H.Y., and Hunt,M.D. (1996)** Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**:1809-1819.
- Ryan,C.A. (2000)** The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1477**:112-121.
- Ryan,C.A. and Moura,D.S. (2002)** Systemic wound signaling in plants: A new perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:6519-6520.

Ryley,R., Bhuiyan,S., Herde,D., and Gordan,B. (2003) Efficacy, timing and method of application of fungicides for management of sorghum ergot caused by *Claviceps africana*. *Australasian Plant Pathology* **32**: 329-338.

Saladie,M., Matas,A.J., Isaacson,T., Jenks,M.A., Goodwin,S.M., Niklas,K.J., Ren,X.L., Labavitch,J.M., Shackel,K.A., Fernie,A.R., Lytovchenko,A., O'Neill,M.A., Watkins,C.B., and Rose,J.K.C. (2007) A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology* **144**: 1012-1028.

Samac,D.A., Hironaka,C.M., Yallaly,P.E., and Shah,D.M. (1990) Isolation and Characterization of the Genes Encoding Basic and Acidic Chitinase in *Arabidopsis-Thaliana*. *Plant Physiology* **93**: 907-914.

Sauter,H., Steglich,W., and Anke,T. (1999) Strobilurins: Evolution of a new class of active substances. *Angewandte Chemie-International Edition* **38**: 1329-1349.

Sbaghi,M., Jeandet,P., Faivre,B., Bessis,R., and Fournioux,J.C. (1995) Development of methods, using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine in vitro cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). *Euphytica* **86**: 41-47.

Scandalios,J.G. (1997) Introduction. *Free Radical Biology and Medicine* **23**: 471-472.

Scarponi,L., Buonauro,R., and Martinetti,L. (2001) Persistence and translocation of a benzothiadiazole derivative in tomato plants in relation to systemic acquired resistance against *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Pest Management Science* **57**: 262-268.

Schaller,G.E. and Bleecker,A.B. (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. *Science* **270**: 1809-1811.

Scheer,J.M. and Ryan,C.A. (2002) The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 9585-9590.

Schenk,P.M., Kazan,K., Wilson,I., Anderson,J.P., Richmond,T., Somerville,S.C., and Manners,J.M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**: 11655-11660.

Schenk,P.M., Kazan,K., Manners,J.M., Anderson,J.P., Simpson,R.S., Wilson,I.W., Somerville,S.C., and Maclean,D.J. (2003) Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology* **132**: 999-1010.

Schilmiller,A.L. and Howe,G.A. (2005) Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 369-377.

Schmelz,E.A., Engelberth,J., Alborn,H.T., O'Donnell,P., Sammons,M., Toshima,H., and Tumlinson,J.H. (2003) Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10552-10557.

Schouten,A., Tenberge,K.B., Vermeer,J., Stewart,J., Wagemakers,L., Williamson,B., and van Kan,J.A.L. (2002) Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* **3**: 227-238.

Schulze-Lefert,P. and Bieri,S. (2005) Recognition at a distance. *Science* **308**: 506-508.

- Schweizer,P., Gees,R., and Mosinger,E. (1993)** Effect of Jasmonic Acid on the Interaction of Barley (*Hordeum-Vulgare* L) with the Powdery Mildew *Erysiphe-Graminis* F Sp *Hordei*. *Plant Physiology* **102**:503-511.
- Scofield,S.R., Tobias,C.M., Rathjen,J.P., Chang,J.H., Lavelle,D.T., Michelmore,R.W., and Staskawicz,B.J. (1996)** Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274**:2063-2065.
- Scott JW, Harbaugh BK. (1989)** Micro-Tom. A miniature dwarf tomato. Florida Agricultural Experimental Station Circular S-370, 1–6.
- Seo,S., Seto,H., Yamakawa,H., and Ohashi,Y. (2001)** Transient accumulation of jasmonic acid during the synchronized hypersensitive cell death in Tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**:261-264.
- Shah,J., Tsui,F., and Klessig,D.F. (1997)** Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**:69-78.
- Shah,J., Kachroo,P., and Klessig,D.F. (1999)** The *Arabidopsis ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* **11**:191-206.
- Shah,J. (2005)** Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **43**:229-260.
- Shan,L.B., Thara,V.K., Martin,G.B., Zhou,J.M., and Tang,X.Y. (2000)** The *Pseudomonas* *AvrPto* protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *Plant Cell* **12**:2323-2337.
- Shao,F., Golstein,C., Ade,J., Stoutemyer,M., Dixon,J.E., and Innes,R.W. (2003)** Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**:1230-1233.
- Sharma,P.C., Ito,A., Shimizu,T., Terauchi,R., Kamoun,S., and Saitoh,H. (2003)** Virus-induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Genetics and Genomics* **269** :583-591.
- Shen,Q.H., Saijo,Y., Mauch,S., Biskup,C., Bieri,S., Keller,B., Seki,H., Ulker,B., Somssich,I.E., and Schulze-Lefert,P. (2007)** Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* **315**:1098-1103.
- Shirano,Y., Kachroo,P., Shah,J., and Klessig,D.F. (2002)** A gain-of-function mutation in an *Arabidopsis* Toll Interleukin-1 Receptor-Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeat type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *Plant Cell* **14**:3149-3162.
- Sholberg,P.L. and Gaunce,A.P. (1995)** Fumigation of Fruit with Acetic-Acid to Prevent Postharvest Decay. *Hortscience* **30**:1271-1275.
- Sholberg,P.L., Bedford,K., and Stokes,S. (2005)** Sensitivity of *Penicillium* spp. and *Botrytis cinerea* to pyrimethanil and its control of blue and gray mold of stored apples. *Crop Protection* **24**:127-134.
- Siemens,J., Keller,I., Sarx,J., Kunz,S., Schuller,A., Nagel,W., Schmulling,T., Parniske,M., and Ludwig-Muller,J. (2006)** Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**:480-494.

Siewers,V., Viaud,M., Jimenez-Teja,D., Collado,I.G., Gronover,C.S., Pradier,J.M., Tudzynski,B., and Tudzynski,P. (2005) Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**:602-612.

Silverstein,K.A.T., Graham,M.A., Paape,T.D., and VandenBosch,K.A. (2005) Genome organization of more than 300 defensin-like genes in arabidopsis. *Plant Physiology* **138**:600-610.

Simonich,M.T. and Innes,R.W. (1995) A Disease Resistance Gene in Arabidopsis with Specificity for the *Avrppp3* Gene of *Pseudomonas-Syringae* Pv *Phaseolicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**:637-640.

Skirdal,I.M. and Eklund,T. (1993) Microculture Model Studies on the Effect of Sorbic Acid on *Penicillium-Chrysogenum*, *Cladosporium-Cladosporioides* and *Ulocladium-Atrum* at Different Ph Levels. *Journal of Applied Bacteriology* **74**:191-195.

Skou,J.P. (1982) Callose Formation Responsible for the Powdery Mildew Resistance in Barley with Genes in the MI-O Locus. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology* **104**:90-95.

Slaymaker,D.H., Navarre,D.A., Clark,D., del Pozo,O., Martin,G.B., and Klessig,D.F. (2002) The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:11640-11645.

Smart,M.G., Aist,J.R., and Israel,H.W. (1986) Structure and Function of Wall Appositions .2. Callose and the Resistance of Oversize Papillae to Penetration by *Erysiphe-Graminis* F-Sp *Hordei*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **64**:802-804.

Smilanick,J.L., Margosan,D.A., Mlikota,F., Usall,J., and Michael,I.F. (1999) Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease* **83**:139-145.

Smilanick,J.L., Mansour,M.F., Gabler,F.M., and Goodwine,W.R. (2006) The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. *Postharvest Biology and Technology* **42**:75-85.

Smilanick,J.L., Mansour,M.F., Gabler,F.M., and Sorenson,D. (2008) Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology* **47**:226-238.

Sofos,J.N. and Busta,F.F. (1981) Anti-Microbial Activity of Sorbate. *Journal of Food Protection* **44**:614-&.

Sofos,J.N. (1993) Current Microbiological Considerations in Food Preservation. *International Journal of Food Microbiology* **19**:87-108.

Sohn,S., Kim,Y., Kim,B., Lee,S., Lim,C.K., Hur,J.H., and Lee,J. (2007) Transgenic tobacco expressing the *hrpN(EP)* gene from *Erwinia pyrifoliae* triggers defense responses against *Botrytis cinerea*. *Molecules and Cells* **24**:232-239.

Sonda,S., Sala,G., Ghidoni,R., Hemphill,A., and Pieters,J. (2005) Inhibitory effect of aureobasidin A on *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**:1794-1801.

Spoel,S.H., Koornneef,A., Claessens,S.M., Korzelius,J.P., Van Pelt,J.A., Mueller,M.J., Buchala,A.J., Metraux,J.P., Brown,R., Kazan,K., van Loon,L.C., Dong,X., and Pieterse,C.M. (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**:760-770.

- Staskawicz,B. and Parniske,M. (2001)** Biotic interactions - Genomic approaches to interactions of plants with pathogens and symbionts. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 279-280.
- Staswick,P.E., Su,W., and Howell,S.H. (1992)** Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 6837-6840.
- Staswick,P.E., Yuen,G.Y., and Lehman,C.C. (1998)** Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant Journal* **15**: 747-754.
- Staswick,P.E., Tiryaki,I., and Rowe,M.L. (2002)** Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405-1415.
- Staswick,P.E. and Tiryaki,I. (2004)** The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2117-2127.
- Stepanova,A.N. and Alonso,J.M. (2005)** Ethylene signaling pathway. *Sci.STKE*. **2005**:cm3.
- Sticher,L., MauchMani,B., and Metraux,J.P. (1997)** Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **35**: 235-270.
- Stratford,M. and Anslow,P.A. (1998)** Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. *Letters in Applied Microbiology* **27**: 203-206.
- Stratmann,J.W. and Ryan,C.A. (1997)** Activation of a 52 kDa MBP kinase by wounding and systemin. *Plant Physiology* **114**: 1443.
- Suarez-Rodriguez,M.C., dams-Phillips,L., Liu,Y.D., Wang,H.C., Su,S.H., Jester,P.J., Zhang,S.Q., Bent,A.F., and Krysan,P.J. (2007)** MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **143**: 661-669.
- Sugar,D. and Spotts,R.A. (1999)** Control of postharvest decay in pear by four laboratory-grown yeasts and two registered biocontrol products. *Plant Disease* **83**: 155-158.
- Suzuki,K., Kato,T., Takahashi,J., and Kamoshita,K. (1984)** Mode of Action of Methyl N-(3,5-Dichlorophenyl)-Carbamate in the Benzimidazole-Resistant Isolate of *Botrytis-Cinerea*. *Journal of Pesticide Science* **9**: 497-501.
- Swiderski, M. R. & Innes, R. W. (2001)** The *Arabidopsis* PBS1 resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant Journal* **26**: 101-112.
- Taguchi,F., Shimizu,R., Inagaki,Y., Toyoda,K., Shiraishi,T., and Ichinose,Y. (2003)** Post-translational modification of flagellin determines the specificity of HR induction. *Plant and Cell Physiology* **44**: 342-349.
- Takesako,K., Kuroda,H., Inoue,T., Haruna,F., Yoshikawa,Y., Kato,I., Uchida,K., Hiratani,T., and Yamaguchi,H. (1993)** Biological Properties of Aureobasidin-A, A Cyclic Depsipeptide Antifungal Antibiotic. *Journal of Antibiotics* **46**: 1414-1420.
- Takeuchi,K., Taguchi,F., Inagaki,Y., Toyoda,K., Shiraishi,T., and Ichinose,Y. (2003)** Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity. *Journal of Bacteriology* **185**: 6658-6665.

Takken,F.L.W. (2000) Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 699-713.

Tamura O. (2000) Resistance development of grey mould on beans towards fluazinam and relevant counter-measures, 10th Symposium of Research Committee of Fungicides Resistance, April 5, 2000 (Abstracts), The Phytopathological Society of Japan, Okoyama, Japan, pp 7–16.

Tang,D.Z., Simonich,M.T., and Innes,R.W. (2007) Mutations in LACS2, a long-chain acyl-coenzyme a synthetase, enhance susceptibility to avirulent *Pseudomonas syringae* but confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **144**:1093-1103.

Tang,X.Y., Frederick,R.D., Zhou,J.M., Halterman,D.A., Jia,Y.L., and Martin,G.B. (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* **274**:2060-2063.

Tao,Y., Xie,Z.Y., Chen,W.Q., Glazebrook,J., Chang,H.S., Han,B., Zhu,T., Zou,G.Z., and Katagiri,F. (2003) Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**:317-330.

Tatsuki,M. and Mori,H. (2001) Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region. *Journal of Biological Chemistry* **276**:28051-28057.

Tenberge, K., Beckedorf, M., Hoppe, B., Schouten, A., Solf, M. and von den Driesch, M. (2002) In Situ Localization of AOS in Host-Pathogen Interactions. *Microscopy and Microanalysis* **8**: 250-251

ten Have,A., Breuil,W.O., Wubben,J.P., Visser,J., and van Kan,J.A.L. (2001) *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genetics and Biology* **33**:97-105.

Terry,L.A., Joyce,D.C., Adikaram,N.K.B., and Khambay,B.P.S. (2004) Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. *Postharvest Biology and Technology* **31**:201-212.

Thaler,J.S., Owen,B., and Higgins,V.J. (2004) The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* **135**:530-538.

Thaler,J.S. and Bostock,R.M. (2004) Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology* **85**:48-58.

Thevissen,K., Warnecke,D.C., Francois,E.J.A., Leipelt,M., Heinz,E., Ott,C., Zahringer,U., Thomma,B.P.H.J., Ferkel,K.K.A., and Cammue,B.P.A. (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry* **279**:3900-3905.

Thibaud,M.C., Gineste,S., Nussaume,L., and Robaglia,C. (2004) Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* through an SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**:81-88.

Thines,B., Katsir,L., Melotto,M., Niu,Y., Mandaokar,A., Liu,G., Nomura,K., He,S.Y., Howe,G.A., and Browse,J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**:661-665.

- Thomma,B.P., Eggermont,K., Penninckx,I.A., Mauch-Mani,B., Vogelsang,R., Cammue,B.P., and Broekaert,W.F. (1998)** Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:15107-15111.
- Thomma,B.P., Eggermont,K., Tierens,K.F., and Broekaert,W.F. (1999)a** Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by Botrytis cinerea. *Plant Physiol* **121**:1093-1102.
- Thomma,B.P., Nelissen,I., Eggermont,K., and Broekaert,W.F. (1999)b** Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of Arabidopsis thaliana to the fungus Alternaria brassicicola. *Plant J.* **19**:163-171.
- Thomma,B.P.H.J., Eggermont,K., Penninckx,I.A.M.A., Mauch-Mani,B., Vogelsang,R., Cammue,B.P.A., and Broekaert,W.F. (1998)** Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:15107-15111.
- Thomma,B.P.H.J. and Broekaert,W.F. (1998)** Tissue-specific expression of plant defensin genes PDF2.1 and PDF2.2 in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**:533-537.
- Thomma,B.P.H.J., Penninckx,I.A.M.A., Broekaert,W.F., and Cammue,B.P.A. (2001)** The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology* **13**:63-68.
- Thomma,B.P.H.J., Cammue,B.P.A., and Thevissen,K. (2002)** Plant defensins. *Planta* **216**:193-202.
- Thompson,D.P. (1996)** Inhibition of growth of mycotoxigenic Fusarium species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection* **59**:412-415.
- Thordal-Christensen,H. (2003)** Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:351-357.
- ThordalChristensen,H., Zhang,Z.G., Wei,Y.D., and Collinge,D.B. (1997)** Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* **11**:1187-1194.
- Tierens,K.F.M.J., Thomma,B.P.H.J., Bari,R.P., Garmier,M., Eggermont,K., Brouwer,M., Penninckx,I.A.M.A., Broekaert,W.F., and Cammue,B.P.A. (2002)** Esa1, an Arabidopsis mutant with enhanced susceptibility to a range of necrotrophic fungal pathogens, shows a distorted induction of defense responses by reactive oxygen generating compounds. *Plant Journal* **29**:131-140.
- Ton,J., Pieterse,C.M.J., and van Loon,L.C. (1999)** Identification of a locus in Arabidopsis controlling both the expression of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) and basal resistance against Pseudomonas syringae pv. tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**:911-918.
- Ton,J. and Mauch-Mani,B. (2004)** beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal* **38**:119-130.
- Ton,J., Jakab,G., Toquin,V., Flors,V., Iavicoli,A., Maeder,M.N., Metraux,J.P., and Mauch-Mani,B. (2005)** Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in arabidopsis. *Plant Cell* **17**:987-999.

Ton, J., D'Alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D., Held, M., Mauch-Mani, B., and Turlings, T.C.J. (2007) Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant Journal* **49**: 16-26.

Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2002) Arabidopsis gp91(phox) homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 517-522.

Tripathi, P. and Dubey, N.K. (2004) Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* **32**: 235-245.

Truman, W., de Zabala, M.T., and Grant, M. (2006) Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant Journal* **46**: 14-33.

Truman, W., Bennett, M.H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., and Grant, M. (2007) Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 1075-1080.

Tudzynski, P. and Siewers, V. (2004) Approaches to molecular genetics and genomics of Botrytis. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* Elad, Y. et al., (eds), pp. 53-66, Kluwer Academic Publishers.

Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J. (1992) Acquired-Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **4**: 645-656.

Unnikrishnan, V. and Nath, B.S. (2002) Hazardous chemicals in foods. *Indian J. Dairy Biosci.* **11**: 155-158.

Uquillas, C., Letelier, I., Blanco, F., Jordana, X., and Holuigue, L. (2004) NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 34-42.

Urena, A.G., Orea, J.M., Montero, C., Jimenez, J.B., Gonzalez, J.L., Sanchez, A., and Dorado, M. (2003) Improving postharvest resistance in fruits by external application of trans-resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 82-89.

Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C., and Boccara, M. (2003) Disruption of Botrytis cinerea pectin methylesterase gene Bcpme1 reduces virulence on several host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 360-367.

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

Valls, M., Genin, S., and Boucher, C. (2006) Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *Plos Pathogens* **2**: 798-807.

van den Burg, H.A., Spronk, C.A.E.M., Boeren, S., Kennedy, M.A., Vissers, J.P.C., Vuister, G.W., De Wit, P.J.G.M., and Vervoort, J. (2004) Binding of the AVR4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions - The chitin-binding site of AVR4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 16786-16796.

- van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.G. (1998)** Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 454-456.
- van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., and Ton, J. (2006)** Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 5602-5607.
- van Kan, J.A.L. (2006)** Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* **11**: 247-253.
- van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V. (1994)** Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **12**: 245-64.
- van Loon, L.C. (1997)** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 753-765.
- van Loon, L.C. and Van Strien, E.A. (1999)** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 85-97.
- van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006)a** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135-162.
- van Loon, L.C., Geraats, B.P.J., and Linthorst, H.J.M. (2006)b** Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* **11**: 184-191.
- Van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. (1999)** Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology* **41**: 537-549.
- Van Wees, S.C.M., Chang, H.S., Zhu, T., and Glazebrook, J. (2003)** Characterization of the early response of Arabidopsis to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. *Plant Physiology* **132**: 606-617.
- Vanwees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., Trijssenaar, A., VantWestende, Y.A.M., Hartog, F., and VanLoon, L.C. (1997)** Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**: 716-724.
- Vellosillo, T., Martinez, M., Lopez, M.A., Vicente, J., Cascon, T., Dolan, L., Hamberg, M., and Castresana, C. (2007)** Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* **19**: 831-846.
- Verberne, MC., Budi Moljono, A.B. Verpoorte, R. (1999)** Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones, 33. Elsevier: 296-312.
- Verberne, M.C., Hoekstra, J., Bol, J.F., and Linthorst, H.J.M. (2003)** Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *Plant Journal* **35**: 27-32.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Goy, P.A., Staub, T., Kessmann, H., and Ryals, J. (1995)** 2,6-Dichloroisonicotinic Acid-Induced Resistance to Pathogens Without the Accumulation of Salicylic-Acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 228-234.
- Veronese, P., Narasimhan, M.L., Stevenson, R.A., Zhu, J.K., Weller, S.C., Subbarao, K.V., and Bressan, R.A. (2003)** Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **35**: 574-587.

Veronese,P., Chen,X., Bluhm,B., Salmeron,J., Dietrich,R., and Mengiste,T. (2004) The BOS loci of Arabidopsis are required for resistance to Botrytis cinerea infection. *Plant Journal* **40**:558-574.

Veronese,P., Nakagami,H., Bluhm,B., AbuQamar,S., Chen,X., Salmeron,J., Dietrich,R.A., Hirt,H., and Mengiste,T. (2006) The Membrane-Anchored Botrytis-Induced Kinase1 Plays Distinct Roles in Arabidopsis Resistance to Necrotrophic and Biotrophic Pathogens. *Plant Cell* **18**:257-273.

Viaud,M., Legeai,F., Pradier,J.M., Brygoo,Y., Bitton,F., Weissenbach,J., Brunet-Simon,A., Duclert,A., Fillinger,S., Fortini,D., Gioti,A., Giraud,C., Halary,S., Lebrun,I., Le Pecheur,P., Samson,D., and Levis,C. (2005) Expressed sequence tags from the phytopathogenic fungus Botrytis cinerea. *European Journal of Plant Pathology* **111**:139-146.

Vijayan,P., Shockey,J., Levesque,C.A., Cook,R.J., and Browse,J. (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:7209-7214.

Vogel,J.P., Raab,T.K., Schiff,C., and Somerville,S.C. (2002) PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**:2095-2106.

Vollenweider,S., Weber,H., Stolz,S., Chetelat,A., and Farmer,E.E. (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. *Plant Journal* **24**:467-476.

Vorwerk,S., Somerville,S., and Somerville,C. (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science* **9**:203-209.

Walters,D.R. and Boyle,C. (2005) Induced resistance and allocation costs: What is the impact of pathogen challenge? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **66**:40-44.

Walters,D.R. and McRoberts,N. (2006) Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science* **11**:581-586.

Walz,A., Zingen-Sell,I., Loeffler,M., and Sauer,M. (2008) Expression of an oxalate oxidase gene in tomato and severity of disease caused by Botrytis cinerea and Sclerotinia sclerotiorum. *Plant Pathology* **57**:453-458.

Wan J, Dunning FM, Bent AF. (2002) Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Funct Integr Genomics* **2**:259-73.

Wang,Y.L., Gao,M.J., Li,Q., Wang,L.Y., Wang,J.J., Jeon,J.S., Qu,N., Zhang,Y.L., and He,Z.H. (2008) OsRAR1 and OsSGT1 physically interact and function in rice basal disease resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**:294-303.

Weichert,H., Stenzel,I., Berndt,E., Wasternack,C., and Feussner,I. (1999) Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves - preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *Febs Letters* **464**:133-137.

White,F.F., Yang,B., and Johnson,L.B. (2000) Prospects for understanding avirulence gene function. *Current Opinion in Plant Biology* **3**:291-298.

Wiese,J., Kranz,T., and Schubert,S. (2004) Induction of pathogen resistance in barley by abiotic stress. *Plant Biology* **6**:529-536.

- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M. (2001)** Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**:562-565.
- Wolter, M., Hollricher, K., Salamini, F., and Schulze-Lefert, P. (1993)** The Mlo Resistance Alleles to Powdery Mildew Infection in Barley Trigger A Developmentally Controlled Defense Mimic Phenotype. *Molecular and General Genetics* **239**: 122-128.
- Woltering, E.J., Balk, P.A., Nijenhuis-de Vries, M.A., Faivre, M., Ruys, G., Somhorst, D., Philosoph-Hadas, S., and Friedman, H. (2005)** An auxin-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase is responsible for differential ethylene production in gravistimulated *Antirrhinum majus* L. flower stems. *Planta* **220**:403-413.
- Wright, C.A. and Beattie, G.A. (2004)** *Pseudomonas syringae* pv. tomato cells encounter inhibitory levels of water stress during the hypersensitive response of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:3269-3274.
- Wurms, K.V. (2005)** Susceptibility to *Botrytis cinerea*, and curing-induced responses of lytic enzymes and phenolics in fruit of two kiwifruit (*Actinidia*) cultivars. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **33**:25-34.
- Wyatt, G.R., Braun, R.P., and Zhang, J. (1996)** Priming effect in gene activation by juvenile hormone in locust fat body. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **32**:633-640.
- Xiao, F.M., Tang, X.Y., and Zhou, J.M. (2001)** Expression of 35S :: Pto globally activates defense-related genes in tomato plants. *Plant Physiology* **126**:1637-1645.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G. (1998)** COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**:1091-1094.
- Xiong, L.Z. and Yang, Y.N. (2003)** Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* **15**:745-759.
- Xu, P., Blancaflor, E.B., and Roossinck, M.J. (2003)** In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with cucumber mosaic virus and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**:467-476.
- Xu, Y., Chang, P.F.L., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1994)** Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. *Plant Cell* **6**:1077-1085.
- Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M.A., and Raskin, I. (1993)** Pathway of Salicylic-Acid Biosynthesis in Healthy and Virus-Inoculated Tobacco. *Plant Physiology* **103**:315-321.
- Yang, P.Z., Chen, C.H., Wang, Z.P., Fan, B.F., and Chen, Z.X. (1999)** A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant Journal* **18**:141-149.
- Yang, S.H., Zhang, Q., Guo, J.H., Charkowski, A.O., Glick, B.R., Ibekwe, A.M., Cooksey, D.A., and Yang, C.H. (2007)** Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:1079-1088.
- Yarden, O. and Katan, T. (1993)** Mutations Leading to Substitutions at Amino-Acids 198 and 200 of Beta-Tubulin That Correlate with Benomyl-Resistance Phenotypes of Field Strains of *Botrytis-Cinerea*. *Phytopathology* **83**:1478-1483.

- Yen,H.C., Lee,S.Y., Tanksley,S.D., Lanahan,M.B., Klee,H.J., and Giovannoni,J.J. (1995)** The Tomato Never-Ripe Locus Regulates Ethylene-Inducible Gene-Expression and Is Linked to A Homolog of the Arabidopsis Etr1 Gene. *Plant Physiology* **107**: 1343-1353.
- Yoshida,S. (2003)** Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 79-84.
- Yoshikawa,M., Tsuda,M., and Takeuchi,Y. (1993)** Resistance to Fungal Diseases in Transgenic Tobacco Plants Expressing the Phytoalexin Elicitor-Releasing Factor, Beta-1,3-Endoglucanase, from Soybean. *Naturwissenschaften* **80**: 417-420.
- Yu,D.Q., Chen,C.H., and Chen,Z.X. (2001)a** Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* **13**: 1527-1539.
- Yu,G.L., Katagiri,F., and Ausubel,F.M. (1993)** Arabidopsis Mutations at the Rps2 Locus Result in Loss of Resistance to Pseudomonas-Syringae Strains Expressing the Avirulence Gene AvrRpt2. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 434-443.
- Yu,X.M., Griffith,M., and Wiseman,S.B. (2001)b** Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. *Plant Physiology* **126**: 1232-1240.
- Zavala,J.A., Patankar,A.G., Gase,K., and Baldwin,I.T. (2004)** Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness costs in *Nicotiana attenuata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 1607-1612.
- Zasloff,M. (2002)** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389-395.
- Zentella,R., Zhang,Z.L., Park,M., Thomas,S.G., Endo,A., Murase,K., Fleet,C.M., Jikumaru,Y., Nambara,E., Kamiya,Y., and Sun,T.P. (2007)** Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037-3057.
- Zeringue,H.J. (1992)** Effects of C-6-C-10 Alkenals and Alkanals on Eliciting A Defense Response in the Developing Cotton Boll. *Phytochemistry* **31**: 2305-2308.
- Zhang,P.Y., Chen,K.S., He,P.Q., Liu,S.H., and Jiang,W.F. (2008)** Effects of crop development on the emission of volatiles in leaves of *Lycopersicon esculentum* and its inhibitory activity to *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 84-91.
- Zhang,S.Q. and Liu,Y.D. (2001)** Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell* **13**: 1877-1889.
- Zhang,Y.L., Fan,W.H., Kinkema,M., Li,X., and Dong,X.N. (1999)** Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6523-6528.
- Zhao,Y.F., Thilmony,R., Bender,C.L., Schaller,A., He,S.Y., and Howe,G.A. (2003)** Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant Journal* **36**: 485-499.
- Zhou,N., Tootle,T.L., Tsui,F., Klessig,D.F., and Glazebrook,J. (1998)** PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 1021-1030.

Zhu,B.L., Chen,T.H.H., and Li,P.H. (1993) Expression of An Aba-Responsive Osmotin-Like Gene During the Induction of Freezing Tolerance in Solanum-Commersonii. *Plant Molecular Biology* **21**: 729-735.

Zhu,Y.M., Nam,J., Carpita,N.C., Matthyse,A.G., and Gelvin,S.B. (2003) Agrobacterium-mediated root transformation is inhibited by mutation of an Arabidopsis cellulose synthase-like gene. *Plant Physiology* **133**:1000-1010.

Zimmerli,L., Jakab,C., Metraux,J.P., and Mauch-Mani,B. (2000) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta-aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:12920-12925.

Zimmerli,L., Metraux,J.P., and Mauch-Mani,B. (2001) beta-aminobutyric acid-induced protection of Arabidopsis against the necrotrophic fungus Botrytis cinerea. *Plant Physiology* **126**:517-523.

Zimmerli,L., Stein,M., Lipka,V., Schulze-Lefert,P., and Somerville,S. (2004) Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. *Plant Journal* **40**:633-646.

Zimmermann,P., Hirsch-Hoffmann,M., Hennig,L., and Gruissem,W. (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* **136**:2621-2632.

Zipfel,C., Robatzek,S., Navarro,L., Oakeley,E.J., Jones,J.D.G., Felix,G., and Boller,T. (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* **428**:764-767.

Zipfel,C. and Felix,G. (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology* **8**:353-360.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS QUE RECOGEN PARTE DE LOS RESULTADOS MOSTRADOS EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

Vicedo B., Leyva, M.O., Flors V., Finiti I., del Amo G., Walters D., Real M.D., García-Agustín P., González-Bosch C. (2006) Control of the phytopathogen *Botrytis cinerea* using adipic acid monoethyl ester. *Archives of Microbiology* **184**: 316-326.

Leyva M.O., Flors V., Vicedo B., Finiti I., Real M.D., García-Agustín P., B. Bennett A., González-Bosch C. (2007) Absence of the endo- β -1,4-gluconases Cel 1 and Cel 2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *The Plant Journal* **52**: 1027-1040.

Leyva M.O., Vicedo B., Finiti I., Flors V., del Amo G., Real M.D., García-Agustín P., González-Bosch C. (2008) Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. *Plant Pathology* **57**: 1038–1046.