



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA**

***Evaluación de Miconic y otros
productos comerciales en la resistencia
de tomate a distintos patógenos
fúngicos***

TRABAJO FIN DE GRADO

Héctor Núñez Pérez

FEBRERO 2015

Índice:

Resumen	3
1. Introducción	4
1.1 El tomate:	4
1.2 El mildiu del tomate o tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>):	5
1.3 Interacción planta-patógeno:	6
1.4 Resistencia Inducida:	8
1.5 Peroxidasas (Familia PR-9):	8
1.6 β -1,3-glucanasas (Familia PR-2):	9
2. Objetivos del trabajo:	10
3. Material y Métodos:	11
3.1 Material Vegetal:	11
3.2 Material fúngico:	11
3.3 Tratamiento de las plantas:	11
3.4 Método de inoculación:	12
3.5 Extracción y determinación de la actividad peroxidasa	13
3.6 Extracción de RNA y síntesis de cDNA :	13
3.7 Diseño de cebadores y medida de la expresión génica	13
3.8 Análisis estadísticos:	14
4. Resultados y Discusión:	15
4.1 Inducción de resistencia:	15
4.2 Actividad de la peroxidasa tras el tratamiento con Miconic:	17
4.3 Expresión del gen PR-2 (β -1,3-glucanasa) tras el tratamiento con Miconic:	19
5. Conclusiones:	21
6. Bibliografía:	23

Resumen

Tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) treated with Miconic showed a smaller lesion size after inoculation with *P. infestans*. It was checked if this protection was due to an induction of resistance by the Miconic product by measuring peroxidase activity and expression of PR-2 (β -1,3-glucanases) gene, both processes related to defense against pathogens in plants. The peroxidase activity was not influenced by the treatment. However, the level of expression of PR-2 gene was drastically increased after application of Miconic, even having effects over time. Therefore, treatment with the product causes an induction of resistance, due to its effect on β -1,3-glucanases.

Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), tratadas con Miconic mostraron un tamaño de lesión menor después de la inoculación con *P. infestans*. Se comprobó si esta protección era debida a una inducción de resistencia por el producto Miconic mediante la medición de la actividad peroxidasa y la expresión del gen PR-2 (β -1,3-glucanasas), ambos procesos relacionados con la defensa frente a patógenos en plantas. La actividad de la peroxidasa no varió con el tratamiento, sin embargo, el nivel de expresión del gen PR-2 fue aumentado drásticamente tras la aplicación de Miconic, pudiendo incluso mantener su efecto en el tiempo. Por lo tanto el tratamiento con el producto provoca una inducción de resistencia, debido al efecto que produce sobre las β -1,3-glucanasas.

1. Introducción

1.1 El tomate:

El tomate, *Solanum lycopersicum* L., pertenece a la familia *Solanaceae*, una de las más grandes del reino vegetal. Las solanáceas comprende aproximadamente 98 géneros y alrededor de 2700 especies. Son una familia de plantas arbustivas o leñosas con hojas alternas, simples y sin estípulas, mientras que las flores son hermafroditas, solitarias o reunidas en inflorescencias cimosas. Es una familia cosmopolita distribuyéndose por todo el planeta a excepción de las zonas más frías como la Antártida y de los desiertos más áridos.

Es una especie originaria del Oeste de Sudamérica y Centroamérica, en la zona que comprende desde el sur de México a Perú. De acuerdo con Andrew Smith (1994), el tomate se originó muy probablemente en las tierras altas de la costa occidental de Sudamérica y desde ahí emigró a América Central. Los mayas y otras culturas de la región utilizaron el fruto para su consumo y ya hacia el siglo XVI se cultivaba en México meridional, y en otras áreas. Los españoles distribuyeron el tomate a lo largo de sus colonias en el Caribe después de la conquista de Sudamérica.

En la actualidad, el cultivo del tomate se encuentra ampliamente extendido, ya que está adaptado a un amplio rango de condiciones climáticas. En España, el tomate es la hortaliza que ocupa la mayor superficie de cultivo (46.623 Ha), con una producción anual que casi llega a los 4 millones de toneladas. (Tabla 1.1).

Tabla 1.1.: Principales cultivos de hortalizas en España. Fuente: Elaborada a partir de los datos proporcionados por el ministerio Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

CULTIVO	Superficie Ha.	Producción Tm.
Tomates	46.623	3.776.796
Lechuga	33.669	904.277
Coliflor y brócoli	30.381	540.893
Melón	26.723	856.951
Cebolla	22.008	1.214.501
Ajo	20.197	188.840
Pimiento	18.108	1.016.811

1.2 El mildiu del tomate o tizón tardío (*Phytophthora infestans*):

El mildiu del tomate es una enfermedad que actualmente se encuentra extendida por todo el mundo, presentándose siempre bajo condiciones de temperatura y humedad que le sean favorables en multitud de especies vegetales, afectando a gran variedad de solanáceas, entre las que se encuentra el tomate. Las principales fuentes de inóculo de esta enfermedad son los restos vegetales, siendo diseminados por el campo por medio de agentes como el viento y la lluvia, pudiendo llegar a recorrer grandes distancias (Jones, 2001).

Los síntomas iniciales en la planta son la aparición de manchas de color verde claro o verde oscuro, transformándose en necróticas cuando la enfermedad se presenta más avanzada. Este avance es muy rápido llegando a invadir toda la hoja. En el envés de la hoja, esta mancha se corresponde generalmente con un fino velo blanco (Jones, 2001).

A día de hoy los cultivos son solo parcialmente resistentes a la enfermedad, por lo que todavía es necesario el uso frecuente de fungicidas, los cuales tienen efectos adversos para el ambiente y la salud humana (Thakur y Sohal, 2013). El agente causal de esta enfermedad es el oomiceto *Phytophthora infestans*. Este patógeno pertenece al Phylum Oomycota, clase Oomicetes, orden Peronosporales, familia Pythiaceae y género *Phytophthora* (Dick, 1990). Por lo general se reproduce asexualmente. Su ciclo de vida comienza generalmente cuando los esporangios son transportados por el viento o en la tierra con partes de la planta y libera sus zoosporas. Esto ocurrirá cuando las condiciones sean húmedas y frías y recibe el nombre de germinación indirecta. Estas esporas son biflageladas, lo cual es característico de los Oomicetes y nadarán hasta que se enquistan en el huésped. Cuando las condiciones son más cálidas, *P. infestans* infecta a la planta, directamente con un tubo germinal que formará desde el esporangio y penetrará en el tejido huésped lo que le permitirá obtener los nutrientes (Schumann y D'Arcy, 2000) (Fig. 1.1).

La reproducción sexual puede ocurrir cuando ambos gametos de apareamiento estén presentes, el anteridio y el oogonio (las únicas partes haploides en el ciclo de vida de *P. infestans*), sus núcleos se fusionen (cariogamia) cuando el anteridio entra en el oogonio y se formará una oospora diploide, que se desarrollará en un esporangio y el ciclo continuará tal cual lo haría asexualmente (Schumann y D'Arcy 2000) (Fig. 1.1).

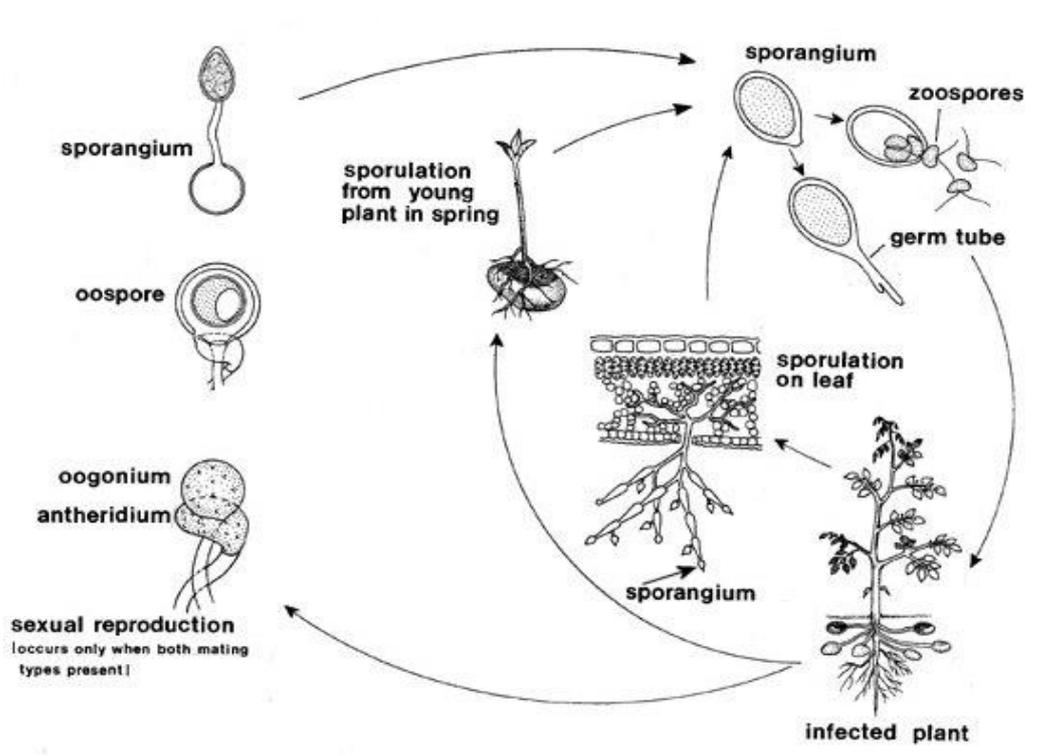


Figura 1.1 Representación del ciclo vital de *P. infestans*. Fuente: Schumann y D'Arcy (2000).

1.3 Interacción planta-patógeno:

Las plantas se encuentran en continuo contacto con un gran número de microorganismos potencialmente patógenos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas, debido a la presencia de varios mecanismos de defensa. Solo si los patógenos consiguen sobrepasarlas se produce una gran pérdida de rendimiento para la planta (Thakur y Sohal, 2013),

Una visión actual del sistema inmunitario de la planta puede ser representada como un modelo de cuatro fases 'zigzag' (Fig. 1.2) (Jones y Dangl, 2006). La fase 1 implicaría el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), lo que resulta en la inmunidad desencadenada por PAMPs (PAMP-triggered immunity, PTI) que puede detener la colonización. Si el

patógeno es capaz de sortear esta primera línea de defensa comienza la segunda fase en la que los patógenos exitosos despliegan efectores específicos que contribuyen a la virulencia. Los efectores pueden interferir con PTI. Esto tiene como resultado la susceptibilidad desencadenada por el efector (effector-triggered susceptibility, ETS). En la fase 3, este efector será reconocido específicamente por una proteína del huésped, lo que se conoce como inmunidad desencadenada por efectores (effector-triggered immunity, ETI). ETI no es más que una respuesta PTI acelerada y amplificada, por lo que ayuda en la resistencia a enfermedades y, por lo general, genera una respuesta hipersensible (HR) en el sitio de la infección y que se manifiesta inicialmente con la muerte celular programada de algunas células (necrosis), para así impedir el avance del patógeno. Asociados a la HR se producen, rápidamente, toda una serie de eventos que incluyen un rápido flujo de iones a través de la membrana plasmática (Nurnberger et al., 1994), la producción de especies activas de oxígeno (peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y aniones superóxido) en lo que se ha denominado estallido oxidativo (Apóstol et al., 1989), así como cambios en el estado de fosforilación de varias proteínas (Dietrich et al., 1990). Por último, en la fase 4, la selección natural permite a los patógenos evitar la ETI, ya sea por el cambio o la diversificación del gen efector reconocido, o mediante la adquisición de efectores nuevos a través de flujo horizontal de genes que pueden ayudar al patógeno a reprimir la ETI. Por lo tanto la selección también va favorecer a las nuevas plantas con alelos que puedan reconocer estos efectores de reciente adquisición, lo que nuevamente va a desencadenar la inmunidad desencadenada por efectores (ETI).

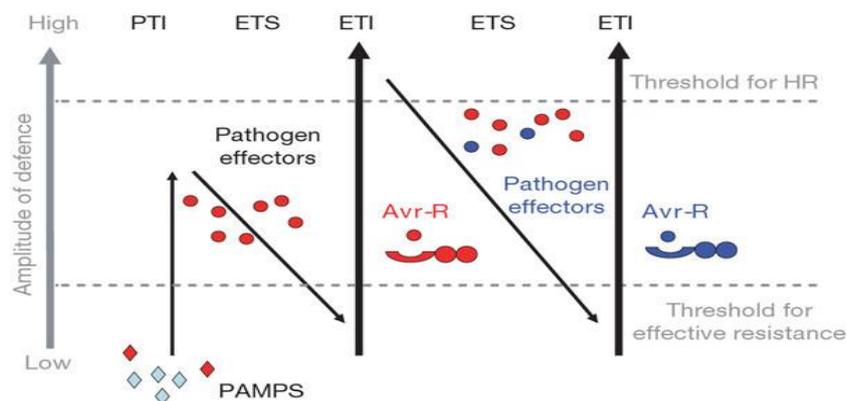


Figura 1.2: Inmunidad en plantas según el modelo Zig-Zag. Fuente: Jones y Dangl (2006).

En cualquier caso, la inmunidad innata de la planta parece activar tanto mecanismos de defensa pasivos como activos/inducidos cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. (Boller y He, 2009; Tsuda y Katagiri, 2010).

1.4 Resistencia Inducida:

Los mecanismos inducidos se activan solamente como una respuesta al reconocimiento de un estímulo extrínseco. Este estado puede ser activado tanto por ETI como por PTI. Los agentes inductores de resistencia pueden ser de naturaleza biótica o abiótica. Dentro de los compuestos abióticos, el ácido amino butírico, el benzotiodiazol, el ácido salicílico o el ácido dicloroisonicotínico, han demostrado ser inductores de resistencia (Amzalek y Cohen, 2007). Entre los agentes bióticos capaces de inducir resistencia podemos encontrar virus, bacterias, levaduras y hongos (Punja y Utkhede, 2003). Van a existir tres tipos de respuestas inducidas llevadas a cabo por factores bióticos y abióticos: la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), la Resistencia Sistémica Inducida (ISR), llevada a cabo por microorganismos no patogénicos y la resistencia inducida por herbívoros (Pieterse y Van Loon, 1999).

La SAR está relacionada con la acumulación rápida de ácido salicílico (SA) que conlleva una activación de la expresión de los genes que codifican para las proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogénesis) como son β -1,3-glucanasas y quitinasas, la formación de peróxido de hidrógeno y la activación de enzimas oxidativas fuertemente reactivas como la peroxidasa (Ward et al., 1991).

Al contrario que la SAR, la ISR no está mediada por SA sino por ácido jasmónico (JA) y etileno, y no está asociada a la aparición de proteínas PR (Vallad y Goodman, 2004). Otra característica de la ISR que la diferencia de la SAR es la ausencia en la ISR de una respuesta hipersensible o de necrosis.

1.5 Peroxidasas (Familia PR-9):

Las peroxidasas son glicoproteínas que contienen un grupo hemo y catalizan la oxidación a través del H_2O_2 . Se encuentran ampliamente distribuidas en el Reino Vegetal. Las peroxidasas se clasifican en dos grandes superfamilias, una que incluye a las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas, y otra superfamilia (no relacionada estructuralmente con la anterior) constituida por las peroxidasas animales (Hiraga et al., 2001).

Se distinguen tres clases de peroxidasas: clase I: compuesta por la citocromo c, peroxidasa mitocondrial de levaduras, la ascorbato peroxidasa, responsable de la eliminación de H_2O_2 en cloroplastos y citosol de plantas superiores y las peroxidasas bacterianas (Jespersen et al., 1997). La clase II: agrupa a todas las peroxidasas de hongos (Eisenstadt y Bogolitsyn, 2010). Por último, las de clase III son las peroxidasas de secreción vegetal, que son las que nos van a interesar para este estudio. Son de naturaleza glicoproteica y están localizadas en las vacuolas y en las paredes vegetales debido a la gran cantidad de sustratos que son capaces de oxidar.

Las funciones de esta enzima son difíciles de concretar debido a la baja afinidad que presentan por el sustrato (Hiraga et al., 2001). También podemos considerarlas enzimas bifuncionales ya que pueden oxidar tanto sustratos en presencia de H_2O_2 como producir especies reactivas de oxígeno. Estas enzimas participan en multitud de procesos fisiológicos a lo largo de la vida de la planta, como son la germinación, el crecimiento celular o la senescencia. Asimismo, desempeñan un importante papel en la oxidación de fenoles (Lagrimini, 1991) y especialmente en la lignificación (Quiroga et al., 2000), dos procesos clave en la defensa frente a patógenos.

1.6 β -1,3-glucanasas (Familia PR-2):

Estas proteínas son capaces de hidrolizar las uniones 1,3- β -D-glucosídicas en los β -1,3-glucanos. Existen tres clases: las β -1,3 glucanasas de la clase I, son proteínas básicas localizadas en la vacuola, mientras que las de las clases II y III son proteínas ácidas secretadas al espacio extracelular. Nuestro principal interés radica en su posible papel en la defensa de la planta. Las β -1,3 glucanasas actúan de dos formas diferentes: directamente, degradando la pared celular del patógeno, o indirectamente, provocando la liberación de materiales de la pared celular que actúan como elicitores de las reacciones de defensa (Bowles, 1990). Todavía no se ha probado que las glucanasas participen en la generación de señales. También parece que existen otras respuestas de defensa que llevan a la activación de los genes de defensa de forma más rápida que las β -1,3-glucanasas, de modo que la acumulación de éstas probablemente sólo contribuya a la protección de la planta por su acción.

2. Objetivos

En este trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

- Inducción de resistencia a *P. infestans* en tomate usando como agente inductor el compuesto comercial Miconic, de la empresa BioVert S.A.
- Análisis de la actividad peroxidasa (POD) y de la expresión del gen β -1,3 glucanasa (GLU) como indicadores del desencadenamiento de los mecanismos de defensa de la planta en respuesta a la inducción.

3. Material y Métodos

3.1 Material Vegetal

Se utilizaron semillas de tomate de la variedad comercial MoneyMaker, proporcionadas por la empresa "Thompson & Morgan" (Ipswich, UK). Las semillas fueron esterilizadas mediante inmersión en una solución de lejía al 10% durante 15 minutos. Tras la desinfección, se lavaron abundantemente con agua destilada y se sembraron en bandejas utilizando como sustrato vermiculita estéril. Una vez germinadas se trasplantaron a bandejas de alveolos individuales en las que se utilizó como sustrato con mezcla de tierra y perlita (2:1). La germinación y posterior crecimiento de las plántulas se realizó en una cámara de cultivo, con condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo: 16 h luz/ 8 h oscuridad a 25°C /18°C, respectivamente.

3.2 Material fúngico

El aislado de *P. Infestans* NLI525, obtenido de plantas de tomate, fue amablemente cedido por el Dr. Geert Kessel, del University and Research Center of Wageningen (Holanda). Este aislado se mantuvo placa Petri con medio PDA (Patata Dextrosa Agar) a 20-22°C y en oscuridad. Cuando el micelio cubría toda la placa, se realizaron repicados en el borde de aproximadamente 2 cm² que eran transferidos a nuevas placas de medio PDA para promover el crecimiento.

Para obtener el inóculo, el cultivo del Oomiceto se inició 10 días aproximadamente antes de la infección. La suspensión de esporangios se obtuvo añadiendo 3 ml de agua destilada estéril y fría (4°C) sobre la placa, frotando repetidamente toda la superficie del agar con un asa de Digralski previamente esterilizada. Todos los procesos se realizaron en una cámara de flujo laminar. Para el recuento de esporangios se utilizó una cámara de Malassez, lo que permitió conocer la concentración de la suspensión, que se ajustó a 1x10⁵ esporangios/ml.

3.3 Tratamiento de las plantas

La inducción de resistencia se realizó con el producto Manvert miconic de la empresa Biovert S.A. (Lleida, España). Este compuesto se comercializa como un bioactivador del sistema inmunológico formulado con aminoácidos y ácidos orgánicos. Su composición química se recoge en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Composición del Manvert miconic.

Componentes	%p/p	%p/v
Ácidos orgánicos	47,0	51,7
Aminoácidos libres	6,0	6,6
Nitrógeno Total (N)	5,0	5,5
Nitrógeno amoniacal (N)	4,9	5,4
Nitrógeno orgánico (N)	0,1	0,1

Las hojas de las plantas fueron rociadas a los 14 días en diferentes grupos según su tratamiento. Se separaron plantas control, rociadas solamente con agua y plantas tratadas con Miconic, las cuales se dividieron en tres tratamientos a tres concentraciones diferentes de Miconic 1,5, 3 y 4,5 ml/L.

Posteriormente, a las 24 horas y a los 7 días después de la aplicación de los tratamientos, se tomaron muestras de hojas en las tres concentraciones de Miconic y control. Estas hojas se pesaron y se congelaron con nitrógeno líquido, siendo conservadas a -80 °C hasta el momento de su estudio.

3.4 Método de inoculación

La inoculación se realizó 7 días después del tratamiento de las plantas con Miconic, usando 5 plantas de cada tratamiento: plantas control y plantas tratadas con las diferentes concentraciones de Miconic. Para realizar la inoculación se usaron 10 µl de la suspensión de esporangios que se dispusieron en las hojas más grandes de las plantas, evitando los nervios foliares y pipeteando como máximo 2 gotas por cada hoja.

A los 6 días tras la infección, se realizaron medidas del tamaño de las lesiones necróticas producidas por el hongo en las hojas de las plantas control y en las plantas tratadas Miconic. Para realizar estas medidas se utilizó un calibre digital Mitutoyo, con su correspondiente software para PC.

3.5 Extracción y determinación de la actividad peroxidasa

Las muestras recogidas a las 24 horas y 7 días tras el tratamiento, fueron homogeneizadas a 4°C en un mortero con tampón Tris-HCl pH 7,5 que contenía KCl 1M. En el momento de la homogeneización se añadieron 0,15 gramos de PVPP por cada 10 gramos de tejido. El homogeneizado se centrifugó a 21000g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se consideró como fracción proteica que se purificó mediante diálisis durante 12h con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

La actividad peroxidasa de las distintas muestras se determinó a 25°C en un espectrofotómetro Helios γ Thermo. Para ello, se utilizó un tampón Tris acetato 50mM pH 5,0, con H₂O₂ 0,5mM y con 4-metoxi-anaftol 1 mM ($\epsilon_{595} = 21,6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) como donador de electrones. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C. Las actividades enzimáticas se expresaron en nanokatales (nkat), unidad que se define como aquella cantidad de enzima capaz de convertir un nanomol de sustrato en producto por segundo.

3.6 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Las muestras de hojas se tomaron a las 24 horas y a los 7 días y se homogenizaron en un mortero utilizando nitrógeno líquido, el polvo obtenido se empleó para la extracción de RNA mediante el AurumTM Total RNA mini kit de BioRad, siguiendo el protocolo que especifica el fabricante. La cantidad de RNA obtenido se determinó espectrofotométricamente a 260nm. Una vez establecida la concentración, 500 ng del RNA total se utilizaron como molde para su retrotranscripción a cDNA empleando iScript cDNA synthesis kit de BioRad.

3.7 Diseño de cebadores y medida de la expresión génica

Los cebadores para PCR en tiempo real, se diseñaron con el software Primer3 (Untergrasser *et al.*, 2012) a partir de las secuencias de los genes disponibles en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) y en el Munich Information Center for Protein Sequence (MIPS) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/tomato/index.jsp>) (Tabla 3.1). El gen de la β -1,3-glucanasa (GLU) fue seleccionado en base a su sobreexpresión en un estudio previo de microarrays (datos no publicados). El gen de la tubulina β de tomate fue utilizado como “housekeeping” o control endógeno que se expresa constitutivamente (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Tabla con las secuencias de los oligodinucleótidos empleados en la PCR en tiempo real.

Oligo	Gen	Secuencia (5'-3')	Amplicón (bp)
GLU_fw	NC_015438.1	gaagctggtttgggaaatga	150
GLU_rv		tgcacgtgtatccctcaaaa	
Tubulina_f	Solyc04g081490.2.	atggtccttgacaacgaagc	165
Tubulina_rv		cacagccaatttcctcaggt	

La expresión génica relativa se cuantificó con el sistema de PCR en tiempo real iCycler iQ (BioRad). La mezcla de reacción (50 µl) se preparó incluyendo 0,3 µl de cada cebador, 2,5 µl de cDNA y 1xIQ SYBR Green Supermix (BioRad). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificación: 95 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos y 72 °C 50 segundos. Finalmente se añadió un paso de elongación a 72 °C durante 5 minutos.

El análisis de los resultados se realizó con el software del fabricante, Optical System Software 3.0 (BioRad). Después de cada reacción de PCR se comprobaba la existencia de un único pico en las curvas de “melting”. Se empleó el gen de la tubulina β como control endógeno que se expresa constitutivamente. Se aplicó el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen y Livak, 2008), donde $\Delta\Delta Ct = [Ct\ GLU\ (muestra\ desconocida) - Ct\ TUB\ (muestra\ desconocida)] - [Ct\ GLU\ (muestra\ control) - Ct\ TUB\ (muestra\ control)]$. El Ct se define como aquel ciclo en el que la emisión de fluorescencia por el producto de la PCR puede distinguirse del fondo. GLU es el gen de interés y TUB es el control interno o calibrador (el gen de la tubulina). La muestra control es la muestra que representa el valor 1× de expresión para el gen de interés y en nuestro caso son muestras de hojas tratadas con agua. Cada medida de expresión se realizó por duplicado.

3.8 Análisis estadísticos:

En este ensayo se utilizó la prueba t de Student para comprobar si existen diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Para ello se utilizó el software Microsoft Excel.

4. Resultados y Discusión:

4.1 Inducción de resistencia:

La inducción de resistencia se realizó con tres concentraciones diferentes del producto Miconic 1,5, 3 y 4,5 ml/L. La capacidad de inducción de este compuesto se determinó a los 6 días tras la infección con el oomiceto *P. infestans*, midiendo los diámetros de las lesiones necróticas producidas (Fig. 4.1).



Figura 4.1: Imágenes que muestran la lesión producida por *P. infestans*.

Como consecuencia de la infección, las células de la planta se sensibilizan durante la germinación de las esporas (Isaac, 1992) y esto va dar lugar a una respuesta HR, esta es una reacción local y se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas en el sitio de infección. Como consecuencia de la respuesta HR se detiene la invasión del patógeno en las células inicialmente infectadas, evitando la diseminación del patógeno por toda la planta. (Stange et al., 2007).

Los resultados obtenidos en la inducción de resistencia se muestran en la Fig. 4.2, en la que se representa el diámetro medio de las lesiones necróticas observadas tanto en plantas control como en las tratadas en las tres concentraciones diferentes de Miconic. Comparando los resultados de las plantas control con los 3 tratamientos, observamos que el tamaño de las lesiones necróticas en las plantas tratadas con Miconic es menor que las plantas control. Dentro de las plantas tratadas con las tres concentraciones de Miconic también encontramos diferencias, de modo que aquellas tratadas con la concentración de 3ml/L reflejaron una lesión necrótica superior a las otras 2 concentraciones del producto: 1,5ml/L y 4,5ml/L, siendo las lesiones del tratamiento intermedio 3ml/L ligeramente inferior a la media de lesiones del tratamiento Control, 8,54mm y 9,85mm, respectivamente. De la misma manera y aunque no se ha

estudiado, el número de sitios de infección que se pudo observar a simple vista era menor cuanto mayor era la concentración del producto, es decir, que en algunas zonas donde se depositó la gota con el hongo no se desarrolló la infección.

Cada tratamiento (1,5ml/L, 3ml/L y 4,5ml/L) se comparó con respecto al control, utilizando la prueba de t de Student para comprobar si existían diferencias significativas. En los tres tratamientos se rechaza la hipótesis nula por lo que aceptamos que sí existen diferencias significativas entre los tratamientos.

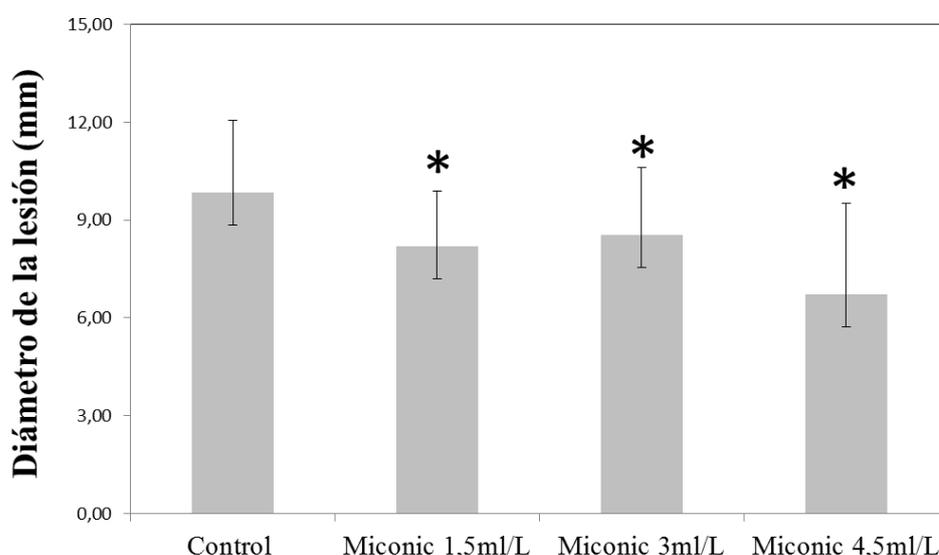


Figura 4.2: Medida de las lesiones necróticas producidas por *Phytophthora infestans* en plantas Control y plantas tratadas con tres concentraciones diferentes de Miconic.

Aunque los datos sugieren una inducción de resistencia, puesto que las plantas tratadas con el producto miconic presentan un diámetro de lesión menor deberíamos confirmarla otros indicadores (ROS, glucanasa, quitinasa...) para comprobar si existe realmente esta inducción. En el caso de la inducción de resistencia usando ácido β -aminobutírico (BABA), induce la formación de especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica, formación de calosa e incrementa el contenido de SA en las hojas. En el tratamiento con BABA también se ha visto que induce la activación de PR como la quitinasa o glucanasa en plantas de tabaco o tomate. Curiosamente, mezclas de BABA y fungicidas fueron aún más eficaces en la reducción de la infección (Walters, Walsh, Newton y Lyon, 2005).

Asimismo, por el hecho de que la aplicación del producto se realizara directamente sobre las hojas, donde posteriormente se depositaron las esporas del patógeno, cabe la posibilidad de que Miconic no actúe solo como un agente inductor de resistencia sino también como un agente fungistático. El principal componente del Miconic son los ácidos orgánicos y hay evidencias que han demostrado que el ácido indol-3-acético (IAA) tiene actividad antifúngica *in vivo* contra *P. infestans* (Martínez-Noël et al., 2001). Para comprobar este supuesto, en nuestro caso sería necesario preparar placas de PDA con diferentes concentraciones de Miconic, y cultivar en ellas *P. infestans* para ver los resultados. Esta auxina (IAA) además de tener propiedades antimicrobianas *in vitro*, también se ha sugerido en otros trabajos que actúa como un elicitor, regulando la enzima glutatión S-transferasa (Hahn y Strittmatter, 1994), la quitinasa y las β -1,3-glucanasas (Hughes y Dickerson, 1991).

4.2 Actividad de la peroxidasa tras el tratamiento con Miconic

Está bien documentado que el tratamiento de plantas con varios agentes (ej: patógenos virulentos o no virulentos, no patógenos, fragmentos de la pared celular, extractos de planta y químicos sintéticos) son capaces de inducir una resistencia en la planta para el posterior ataque del patógeno (Walters, Newton y Lyon, 2005). Esta inducción de resistencia raramente conlleva a un control total de patógeno, después de su inoculación sino más bien a una reducción del número de lesiones y el tamaño de estas (Kuc, 1982).

Cuando esta resistencia es inducida, la planta expresa un número de respuestas de defensa inducibles como pueden ser la producción de glucanasas, síntesis de fitoalexinas, refuerzos en la pared celular por el incremento de la actividad peroxidasa y la deposición de lignina y callosa (Xue et al., 1998).

El objetivo de este experimento era demostrar si la actividad peroxidasa aumentaba substancialmente, tras los diferentes tratamientos realizados a las plántulas de tomate a diferentes concentraciones de Miconic. Según los datos obtenidos, no se detecta un patrón en la variación de la actividad peroxidasa comparando los datos de los tratamientos con respecto al control, tanto a las 24h como a los 7 días, la actividad enzimática en las plantas no sufre variaciones. Por lo tanto, el producto Miconic no parece inducir genes de resistencia relacionados con la producción de peroxidasas (Fig. 4.3).

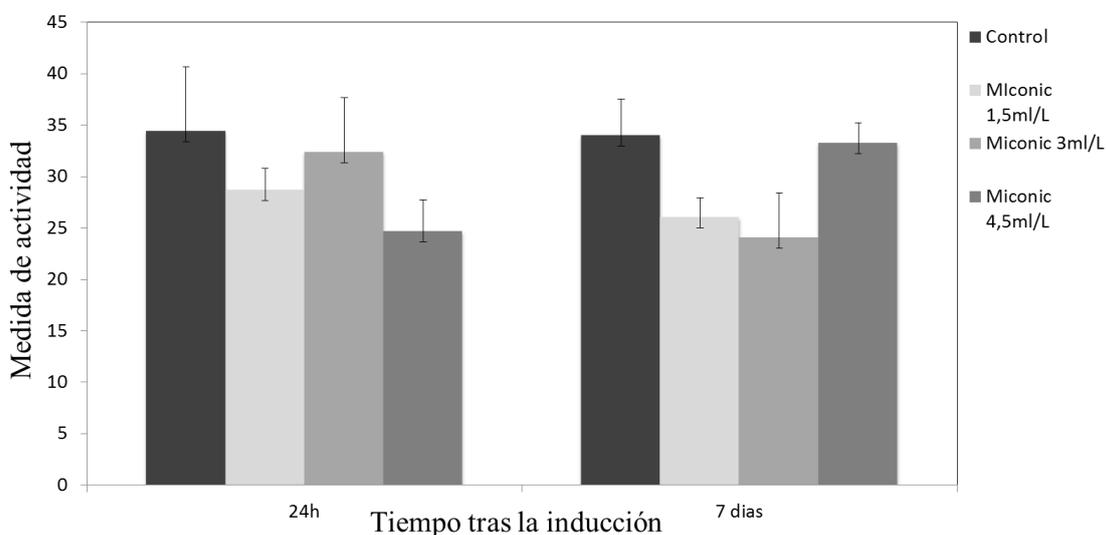


Figura 4.3: Actividad peroxidasa medida a las 24h y a los 7 días de plantas control y tratadas con diferentes concentraciones de miconic.

Otros estudios relacionados con ROS en plantas de tomate, indican que cuando las plantas reconocen patógenos potenciales producen una explosión oxidativa que consiste en la producción de superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Levine et al., 1994). Esta explosión oxidativa, va a desencadenar vías de transducción de la señal para la defensa de la planta, lo cual ocurre en dos fases: la fase I, que es de corta duración, no específica, y se produce a los pocos minutos después del reconocimiento del patógeno y la fase II, que se prolonga más tiempo y se ocurre de 3 a 6h después de la inoculación de los patógenos (Lamb y Dixon, 1997). En la fase II el estallido oxidativo conduce a la respuesta hipersensible y la muerte de la célula.

Por lo tanto, podíamos interpretar que los resultados obtenidos en los ensayos son debidos a que los momentos de máxima actividad POD en la plantas se habrían producido horas antes de la primera medida que se realizó a las 24h. La ausencia de respuesta también puede ser explicada debido a que después de la aplicación del tratamiento, los mecanismos de defensa pueden ser desencadenados directamente por el agente inductor o en algunos casos se activan solamente una vez que se haya producido el contacto con el patógeno, fenómeno conocido como “priming” (Walters y Boyle, 2005).

4.3 Expresión del gen PR-2 (β -1,3-glucanasa) tras el tratamiento con Miconic:

En las muestras se utilizó la técnica de la RT-PCR en tiempo real, la cual nos permitió conocer la expresión relativa del gen PR-2 (β -1,3-glucanasa) en las plantas tratadas con diferentes concentraciones de Miconic. Para ello se emplearon oligos específicos tanto para el gen de interés como para el gen de la tubulina β , que empleamos como control de los niveles de expresión.

La expresión del gen se determinó a 24 horas y a los 7 días del tratamiento. En todos los casos se pudo observar que existía un aumento en la expresión del gen PR-2 en las plantas tratadas con respecto al control. Sin embargo, también pudimos comprobar que a las 24 horas tras la inducción, las plantas tratadas con mayor concentración de Miconic (4,5ml/L) mostraron una mayor expresión del gen; mientras que a 7 días después de la aplicación se produjo todo lo contrario, ya que en este caso son las plantas tratadas con la menor concentración de Miconic (1,5ml/L) donde se observó una mayor expresión. (Fig. 4.4).

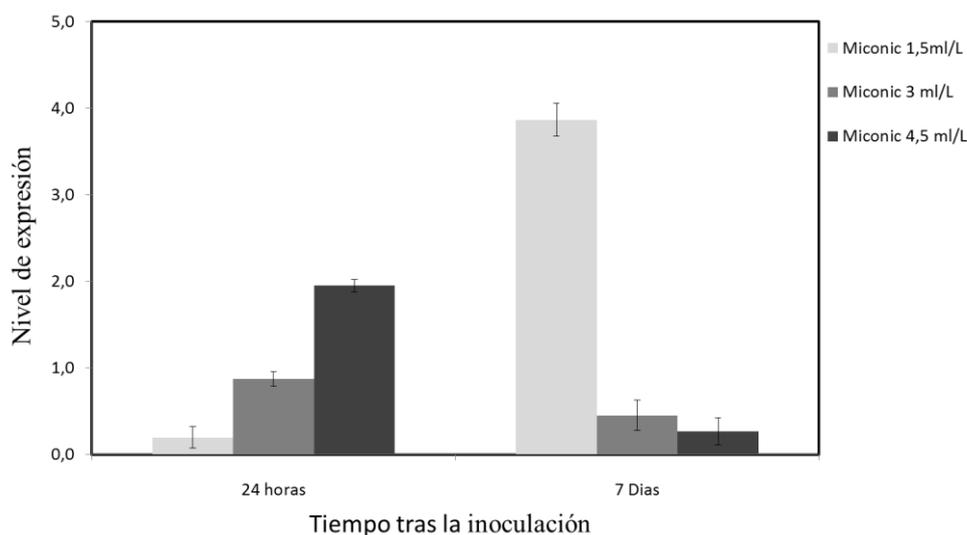


Figura 4.4: Expresión del gen GLU medido a las 24 horas y a los 7 días después del tratamiento con tres concentraciones de Miconic.

Cuando la resistencia es inducida, la planta expresa una serie de respuestas de defensa, una de ellas es la producción de enzimas líticas de pared celular como las quitinasas y 1,3- β -glucanasas (Lawton y Lamb, 1987). La inducción de la expresión de genes b-1,3-glucanasa ya se había visto en plantas de tabaco después de un tratamiento con cobre (Yun et al., 1999; Chmielowska, Veloso, Gutiérrez, Silvar, Díaz, 2010). Las b-1,3-Glucanasas pueden tener un doble papel en la resistencia de la planta contra patógenos, tanto pueden degradar la pared celular del patógeno como liberar oligosacáridos que funcionan como señales para la defensa de la planta (Sarowar et al, 2006).

Las defensas mencionadas anteriormente pueden contribuir a la resistencia contra los patógenos en plantas tratadas, pero no son más que el resultado final de una señalización activa en respuesta al estrés. Hormonas como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y etileno pueden ser también importantes en las respuestas de defensa observadas, puesto que el tratamiento con JA y SA induce la acumulación de proteínas PR como las 1,3- β -glucanasas (Jayaraj et al., 2004).

Otros estudios han revelado que utilizando como inductor un inóculo de una cepa no patógena de *Rhizoctonia* se consiguió un aumento de 18 veces la concentración de 1,3- β -glucanasas con respecto al control (Xue et al 1998). También la inoculación con *Fusarium oxysporum* protege a las plantas contra una posterior infección de *Phytophthora capsici* y se observó que genes relacionados con la defensa como PR-2 (1,3- β -glucanasas) entre otros, son regulados hasta 48h después de la infección (Silvar et al., 2009).

Podemos concluir que los resultados de este estudio muestran una clara inducción de la expresión de genes PR-2 (1,3- β -glucanasas) pudiendo mantener esta expresión a lo largo del tiempo en función de la concentración del producto. Es posible que la concentración intermedia (3ml/L) también resulte efectiva, pero su punto de máxima expresión del gen con ese nivel de concentración se encontrará en un tiempo intermedio que no se ha estudiado.

5. Conclusiones:

The results show a reduction in the size of the necrotic lesions in plants treated with Miconic in comparison with control plants. This reduction was significant for the three concentrations used (1.5 ml/L, 3 ml/L, 4,5 ml/L). However, the intermediate concentration (3 ml/L) was the least effective in reducing the size of the lesions caused by *P. infestans*. Given these results we can conclude that Miconic appears to act as a resistance inductor agent in tomato plants.

POD activity didn't show a clear pattern of variation after the application of Miconic, so we could think this compound doesn't induce an increase in POD activity. However, this lack of activity after induction with Miconic could be explained, according with other studies in which the peaks of maximum activity of POD in plants would have occurred hours before the first measure, which was taken at 24 hours. We can also be facing a phenomenon of "priming" in which the mechanism of defense would be triggered when contact occurs with the pathogen.

The expression of PR-2 (β -1,3-glucanase) gene, which is involved in plant defense response against pathogens attack because they act directly degrading the cell walls, showed a peak expression at 24 hours with the maximum concentration (4,5ml / L) and another peak expression with the lowest concentration at 7 days after starting the treatment with Miconic. According to these results, Miconic seems to have a mode of action that extends over time, depending on the concentration and we can conclude that the product acts as elicitor, inducing a defense response in the plant by activating genes PR-2 (β -1,3-glucanases).

Los resultados obtenidos nos muestran una reducción en el tamaño de las lesiones necróticas en las plantas tratadas con Miconic con respecto a las plantas control. Esta reducción fue significativa para las tres concentraciones a (1,5 ml/L, 3ml/L, 4,5ml/L). Sin embargo, la concentración intermedia de (3 ml/L) fue la menos efectiva a la hora de frenar el tamaño de las lesiones provocadas por *P. infestans*. Ante estos resultados podemos concluir que Miconic parece actuar como un agente inductor de resistencia en plantas de tomate.

La actividad de la POD no mostró un patrón claro de variación tras la aplicación del Miconic, por lo que podríamos pensar que este compuesto no induce un aumento en la actividad POD. Sin embargo, esta falta de actividad tras la inducción con Miconic podrían explicarse ya que, según otros trabajos los momentos de máxima actividad POD en la plantas se habrían producido horas antes de la primera medida que se realizó a las 24h. También podríamos estar ante un fenómeno de “priming” en el que los mecanismos de defensa van a desencadenarse una vez se produzca el contacto con el patógeno.

La expresión del gen PR-2 (β -1,3-glucanasa), que está involucrado en la respuesta defensiva de la planta frente al ataque de patógenos, ya que actúan de manera directa degradando su pared celular, mostró un pico máximo expresión a las 24 horas con la máxima concentración (4,5ml/L) y otro pico de expresión con la mínima concentración a los 7 días tras el tratamiento con Miconic. Según estos resultados, Miconic parece poseer un modo de acción que se prolonga en el tiempo en función de la concentración y podemos concluir que el producto actúa como elicitador, induciendo una respuesta de defensa en la planta mediante la activación de los genes PR-2 (β -1,3-glucanasas).

6. Bibliografía:

- Amzalek, E. y Cohen, Y. (2007). Comparative efficacy of systemic acquired resistance inducing compounds against rust infection in sunflower plants. *Phytopathology* 97, 179-186.
- Apóstol, I., Heinstein, P.F., y Low, P.S. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 90, 109-116.
- Bowles, D.J. (1990). Defense-Related Proteins in Higher Plants. *Annual Review of Biochemistry.* 59, 873-907.
- Boller, T., He, S.Y. (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324, 742-744.
- Chmielowska, J., Veloso, J., Gutiérrez, J., Silvar, C., Díaz, J. (2010). Cross-protection of pepper plants stressed by copper against a vascular pathogen is accompanied by the induction of a defense response. *Plant Science*, 178(2), 176-182.
- Dick, M. W. (1990). Phylum Oomycota. Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., y Chapman, D. J. (eds.). *Handbook of Protoctista*, Boston: Jones & Bartlett. 661-685.
- Dietrich, A., Mayer, J.E., y Hahlbrock, K. (1990). Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J. Biol. Chem.* 265, 6360-6368.
- Eisenstadt, M. A. y Bogolitsyn, K. G. (2010). Peroxidase oxidation of lignin and its model compounds. *Russian Journal of Bioorganic chemistry*, 36, 802-815.
- Hahn, K., Strittmatter, G. (1994). Pathogen-defence gene *prp1-1* from potato encodes an auxin-responsive glutathione S-transferase. *Eur J Biochem.* 226, 619-626
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito H., Ohashi y Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, 42, 462-468.
- Hughes, R.K. y Dickerson, A.G. (1991) Modulation of Elicitor-Induced Chitinase and β -1,3-Glucanase Activity by Hormones in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol.* 32(6), 853-861.
- Isaac, S. (1992). *Fungal-Plant interactions*. London: Chapman & Hall.
- Jayaraj, J., Muthukrishnan, S., Liang, G.H. y Velazhahanv, R. (2004). Jasmonic acid and salicylic acid induce accumulation of β -1,3-glucanase and thaumatin-like proteins in wheat and enhance resistance against *Stagonospora nodorum*. *Biologia Plantarum.* 48(3), 425-430.

- Jespersen, H.M., Kjaersgård, I.V.H., Østergaard, L., Welinder, K.G. (1997). From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochemical Journal* 326, 305–310.
- Jones, J. D. G. y Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*. 444, 323-329.
- Jones, J.B. The American Phytopathological Society. (2001). Translated by M.M.J. Edition illustrated. Publisher Mundi-Prensa. ISBN 8471149435
- Kuc, J. (1982). Induced immunity to plant diseases. *BioScience* 32, 854-860.
- Lagrimini, L.M. (1991). Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiology* 96, 577-583.
- Lamb, C. and Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Lawton, M. A., y Lamb, C. (1987). Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitors, wounding and infection. *Mol. Cell Biol.* 7,335-341.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583–593.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using rea-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Martínez-Noël, G. M. A. M., Madrid, E. A., Bottini, R., and Lamattina, L. (2001). Indole acetic acid attenuates disease severity in potato–*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth in vitro. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 815-823.
- Nurnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., y Scheel, D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78, 449-460.
- Pieterse, C. M. J. y Van Loon, L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Science* 4, 52-58.
- Punja, Z. K. y Utkhede, R. S. (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology* 21, 400-407.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barceló, A., Amaya, I., Medina, M.I., Alonso F.J., Milrad de Forchetti, S., Tigier, H. y Valpuesta, V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* 122, 1119-1127.
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, E.N., Kim, K.D., Choi, J.Y., Hyung, N.I., Shin, J.S. (2006). Constitutive expression of two pathogenesis-related genes in tomato plants enhanced resistance to oomycete pathogen *Phytophthora capsici*, *Plant Cell, Tissue Organ Culture.* 86, 7-14.

- Schmittgen, T.D. y Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3,1101-1108.
- Schumann, G.L. y D'Arcy, C.J. (2000). Late blight of potato and tomato. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0724-01.
- Silvar, C., Merino, F. y J. Díaz, J. (2009). Resistance in pepper plants induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* involves different defence-related genes. *Plant Biology*. 11, 68–74.
- Smith, A.F. (1994). *The Tomato in America*. Publicado: Univ of South Carolina Press.
- Stange, C., Briceño, E., Latorre, B.A. y Arce-Johnson P. (2007) Interacción Planta-patógeno. Libro de Fisiología Vegetal. Eds. Cardemil, L y Squeo, F. Universidad de la Serena.
- Thakur, M., and S. Sohal. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *ISRN Biochemistry* 2013, 1-10.
- Tsuda, K. y Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13,459-465.
- Vallad, G. E. y Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* 44, 1920–1934.
- Walters, D. R., and Boyle, C. (2005). Induced resistance and allocation costs: What is the impact of pathogen challenge. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66, 40-44.
- Walters, D.R., Newton, A.C. y Lyon, G.D. (2005). Induced resistance: Helping plants to help themselves. *Biologist* 52:28-33
- Walters, D.R., Walsh, D., Newton, A.C. y Lyon, G.D. (2005). Induced Resistance for Plant Disease Control: Maximizing the Efficacy of Resistance Elicitors. *Phytopathology* 95(12), 1368–1373.
- Ward, E.R., Ukne, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P., y Ryals, J.A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- Xue, L., Charest, P.M. and Jabaji-Hare, S.H. (1998). Systemic Induction of Peroxidases, 1,3- β -Glucanases, Chitinases, and Resistance in Bean Plants by Binucleate Rhizoctonia species. *Phytopathology* (88), 359–365.
- Yun, H.K., Yi, S.Y., Yu, S.H., Yu, D. Choi, D. (1999). Cloning a pathogenesis-related protein-1 gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its salicylic acid-independent induction by copper and b-aminobutyric acid. *Plant Physiol.* 154, 327–333.