

Influencia de PO212 y el ritmo circadiano sobre la resistencia de pimiento a *Botrytis cinerea*

Influencia de PO212 e o ritmo circadiano sobre a resistencia de pemento a *Botrytis cinerea*

Influence of PO212 and the circadian rhythm on the resistance of pepper to *Botrytis cinerea*



Autor: Pilar Lumbreras Iglesias

Directores: José Díaz Varela y Javier Veloso Freire

Trabajo de fin de máster

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Curso 2016/2017

Julio 2017

Facultad de Ciencias



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

INFORMAN:

Que el presente Trabajo de Fin de Máster presentado por la alumna PILAR LUMBRERAS IGLESIAS y titulado

“Influencia de PO212 y el ritmo circadiano sobre la resistencia de pimiento a *Botrytis cinerea*”

“Influencia de PO212 e o ritmo circadiano sobre a resistencia de pemento a *Botrytis cinerea*”

“Influence of PO212 and the circadian rhythm on the resistance of pepper to *Botrytis cinerea*”

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

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en A Coruña, a 17 de Julio de 2017.

DÍAZ
VARELA
JOSE -
32782379L

Firmado digitalmente por DIAZ
VARELA JOSE - 32782379L
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=32782379L,
sn=DIAZ VARELA,
givenName=JOSE, cn=DIAZ
VARELA JOSE - 32782379L
Fecha: 2017.07.18 18:04:31
+02'00'

Fdo. José Díaz Varela

VELOSO
FREIRE
JAVIER -
44836782F

Digitally signed by VELOSO
FREIRE JAVIER - 44836782F
DN: c=ES,
serialNumber=44836782F,
sn=VELOSO FREIRE,
givenName=JAVIER,
cn=VELOSO FREIRE JAVIER -
44836782F
Date: 2017.07.17 13:00:30
+02'00'

Fdo. Javier Veloso Freire

Agradecimientos

Me gustaría mostrar mi agradecimiento al proyecto "Identificación de los mecanismos de biocontrol de *Penicillium oxalicum* y su aplicación en el control de enfermedades de plantas hortícolas: Señalización, metabolismo fenólico y aplicación en pimiento" financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad-INIA (RTA2013-00060-C05-02) y cofinanciado con fondos FEDER (Unión Europea).

A José Díaz Varela, que me ha guiado durante todos estos meses de trabajo siempre abierto a sugerencias, con comprensión y apoyo. A Javier Veloso Freire por su disposición y aportaciones.

También a Tania García Lamas y a Marta Lois Alvedro por su compañerismo y por prestarme su tiempo y conocimientos.

La realización de este trabajo ha sido una experiencia muy enriquecedora para mí, tanto en conocimientos teóricos como en práctica de laboratorio. Este trabajo no podría haberse realizado sin su colaboración; me llevo un poco de cada uno de ellos, que al final es mucho. Gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	- 4 -
1. INTRODUCCIÓN	- 5 -
1.1 EL PIMIENTO	- 5 -
1.1.1 Importancia económica del pimiento	- 6 -
1.1.2 Usos del pimiento.....	- 6 -
1.1.3 Pimiento de Padrón.....	- 7 -
1.2 ENFERMEDADES DEL PIMIENTO.....	- 7 -
1.2.1 <i>Botrytis cinerea</i>	- 7 -
1.2.1.1 Modo de infección.....	- 8 -
1.3 MÉTODOS DE DEFENSA DE LA PLANTA	- 9 -
1.3.1 Resistencia inducida	- 9 -
1.3.1.1 SAR e ISR.....	- 11 -
1.3.2 Elementos que pueden afectar a la inmunidad de las plantas	- 12 -
1.3.2.1 Ritmo circadiano.....	- 12 -
1.3.2.2 Resistencia inducida por agentes de biocontrol	- 14 -
1.3.2.2.1 <i>Penicillium</i> PO212.....	- 15 -
2. OBJETIVOS.....	- 16 -
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 16 -
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	- 16 -
3.2 MATERIAL FÚNGICO	- 16 -
3.3 MÉTODO DE TRATAMIENTO CON PO212.....	- 17 -
3.3.1 Tratamiento mediante inmersión de las raíces.....	- 17 -
3.3.2 Tratamiento mediante gotas en las hojas.....	- 17 -
3.3.3 Tratamiento mediante la pulverización de las hojas	- 18 -
3.4 MÉTODO DE INOCULACIÓN CON <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	- 18 -
3.5 MÉTODO DE MEDIDA DE LAS LESIONES OCASIONADAS POR <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	- 18 -
3.6 EXPERIMENTO DEL RITMO CIRCADIANO.....	- 18 -
3.7 MÉTODO DE RECOGIDA Y PULVERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	- 19 -
3.8 MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y MEDIDA DE LOS FENOLES.....	- 20 -
3.9 MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y MEDIDA DE LAS PROTEÍNAS TOTALES	- 20 -
3.10 MÉTODO DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA	- 21 -
3.11 MÉTODO DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD B-1,3-GLUCANASA	- 21 -
3.12 MÉTODO DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD QUITINASA	- 22 -
3.13 MÉTODO DE MEDIDA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	- 22 -

3.13.1 Método de extracción de RNA	- 22 -
3.13.2 Método de síntesis de cDNA	- 22 -
3.13.3 Método para la qPCR.....	- 23 -
3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 24 -
4. RESULTADOS	- 24 -
Experimentos de inducción de resistencia por PO212 en <i>C. annuum</i>	- 24 -
Efecto del tratamiento con PO212 por la raíz sobre la resistencia frente a <i>B. cinerea</i>	- 24 -
Efecto del tratamiento con PO212 por gotas en las hojas sobre la resistencia frente a <i>B. cinerea</i>	- 25 -
Efecto del tratamiento con PO212 por pulverización de las hojas sobre la resistencia frente a <i>B. cinerea</i>	- 25 -
Experimentos del ritmo circadiano	- 26 -
Efecto del ritmo circadiano sobre la resistencia frente a <i>B. cinerea</i>	- 26 -
Efecto del ritmo circadiano sobre la cantidad de fenoles en las hojas	- 27 -
Efecto del ritmo circadiano sobre la actividad peroxidasa en las hojas.....	- 28 -
Efecto del ritmo circadiano sobre la actividad glucanasa en las hojas	- 29 -
Efecto del ritmo circadiano sobre la actividad quitinasa en las hojas	- 30 -
Efecto del ritmo circadiano sobre la expresión génica de <i>CaPAL</i> en las hojas.....	- 30 -
Efecto del ritmo circadiano sobre la expresión génica de <i>CaPO1</i> en las hojas	- 31 -
5. DISCUSIÓN	- 32 -
6. CONCLUSIONES	- 36 -
7. BIBLIOGRAFÍA.....	- 37 -

RESUMEN

Penicillium rubens ha sido utilizado en múltiples estudios como un agente de biocontrol de patógenos de plantas. En este trabajo se ha estudiado la capacidad de la cepa PO212 de *P. rubens* para inducir resistencia en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón) frente al ataque del patógeno *Botrytis cinerea*. Según nuestros resultados, PO212 no fue capaz de inducir resistencia en las plantas de pimiento. El otro objetivo de este trabajo consistió en estudiar el efecto del ritmo circadiano, al que están sometidos todos los organismos, sobre la resistencia de plantas de pimiento a *B. cinerea*. Las plantas fueron más resistentes a partir de la segunda mitad del periodo de luz. Así mismo, también se midió el efecto del ritmo circadiano sobre las actividades peroxidasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa, sobre la cantidad de fenoles y sobre la expresión de dos genes: *CaPAL* y *CaPO1*. Se encontró que a lo largo del día existen diferencias significativas en la actividad peroxidasa, el contenido en fenoles, la expresión de *CaPAL* (que disminuyen) y la expresión de *CaPO1* (que aumenta). Estos resultados demuestran que el ritmo circadiano verdaderamente controla muchos elementos de la planta e influye en sus respuestas inmunológicas a lo largo del día.

RESUMO

Penicillium rubens foi utilizado en múltiples estudos como un axente de biocontrol de patóxenos de plantas. Neste traballo estudouse a capacidade da cepa PO212 de *P. rubens* para inducir resistencia en plantas de pemento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón) fronte ao ataque do patóxeno *Botrytis cinerea*. Segundo os nosos resultados, PO212 non foi capaz de inducir resistencia nas plantas de pemento. O outro obxectivo deste traballo consistiu en estudar o efecto do ritmo circadiano, ao que están sometidos todos os organismos, sobre a resistencia de plantas de pemento a *B. cinerea*. As plantas foron máis resistentes a partir da segunda metade do periodo de luz. Así mesmo, tamén se mediu o efecto do ritmo circadiano sobre as actividades peroxidasa, β -1,3-glucanasa e quitinasa, sobre a cantidade de fenóis e sobre a expresión de dous xenos: *CaPAL* e *CaPO1*. Atopouse que ao longo do día existen diferenzas significativas na actividade peroxidasa, o contido en fenóis, a expresión de *CaPAL* (que diminúen) e a expresión de *CAPO1* (que aumenta). Estes resultados demostran que o ritmo circadiano verdadeiramente controla moitos elementos da planta e inflúe nas súas respostas inmunolóxicas ao longo do día.

ABSTRACT

Penicillium rubens has been used as a biocontrol agent for plant pathogens in multiple studies. On this study, we tested the capacity of the *P. rubens* PO212 strain to induce resistance in pepper plants (*Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón) against the attack of the pathogen *Botrytis cinerea*. According to our results, PO212 was unable to induce resistance in pepper plants. The other objective of this work was to study the effect of the circadian rhythm, which affects all the organisms, on the resistance of pepper plants to *B. cinerea*. Likewise, we also studied the effect of the circadian rhythm on peroxidase, β -1,3-glucanase and chitinase activities, on phenol content and on the expression of two genes; *CaPAL* and *CaPO1*. We found that there are significant differences during the day in the peroxidase activity, the amount of phenols, the expression of *CaPAL* (all of them decrease) and the expression of *CaPO1* (which increase). These results demonstrate that the circadian rhythm truly controls many elements of the plant and influences its immunological responses throughout the day.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL PIMIENTO

El pimiento es una hortaliza ampliamente distribuida por todas las zonas templadas y cálidas del mundo. Pertenece al género *Capsicum*, que se encuentra dentro de la familia de las Solanáceas. Este género comprende alrededor de 20 especies distribuidas por todo el mundo. Entre ellas se encuentran *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum pendulum* Willd. y *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav., que son las especies más cultivadas (De, 2003).

La especie más cultivada de pimiento y de mayor importancia económica es *C. annuum* L. (Estrada et al., 2000). Esta especie tiene las flores de color blanco lechoso (Figura 1B), solitarias en cada nudo. Los pedicelos se encuentran usualmente pendientes en la antesis. El cáliz de los frutos maduros no tiene constricción anular en la unión con el pedicelo y las venas son generalmente prolongadas en dientes cortos. La carne del fruto (Figura 1A) es firme y las semillas son de color paja (Figura 1C) (Nuez et al., 1996).

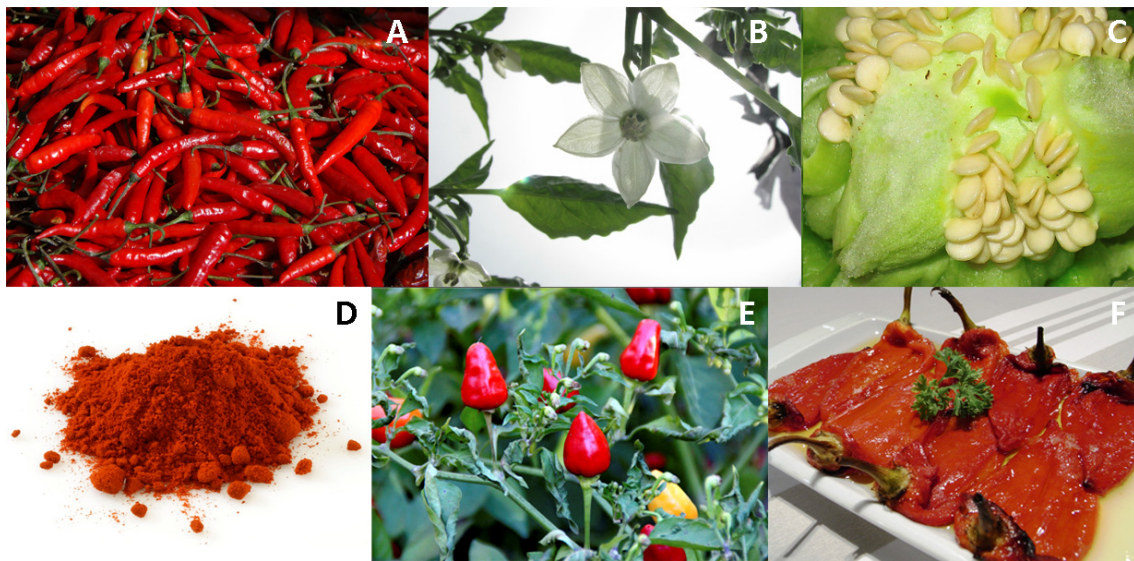


Figura 1: *Capsicum annuum*. A) Frutos de *C. annuum* (State, P. 2009). B) Flor de *C. annuum* (Rodríguez, E. 2009). C) Semillas de *C. annuum* (Poore, S. 2006). D) Pimentón (Hamburguesa Nostra 2010). E) Uso ornamental de *C. annuum* (M-a-n-u-el 2013). F) Pimientos asados (Lastras, J. 2009).

C. annuum incluye tanto frutos grandes y dulces, que se utilizan como hortaliza, como frutos pequeños, dulces o picantes, que se emplean para fabricar pimentón (Figura 1D) (Estrada et al., 2000).

Aunque actualmente el pimiento se distribuye por todo el mundo, se cree que su origen es americano (Estrada et al., 2000), pero gracias a su viabilidad prolongada, a su fácil germinación y a su fácil transporte, fue posible su propagación hacia otros continentes (De, 2003).

1.1.1 Importancia económica del pimiento

El pimiento es el quinto producto hortícola atendiendo a superficie cultivada a nivel mundial (precedido por el tomate, la cebolla, la sandía, y las coles), y el octavo en cuanto a producción total (Nuez et al., 1996; Estrada et al., 2000).

El continente que posee la mayor producción de pimiento es Asia, que produce más de la mitad de todos los pimientos a nivel mundial (Figura 2A). El segundo continente en importancia en cuanto a producción es América, seguida muy de cerca por África y por Europa (Fao.org, 2014).

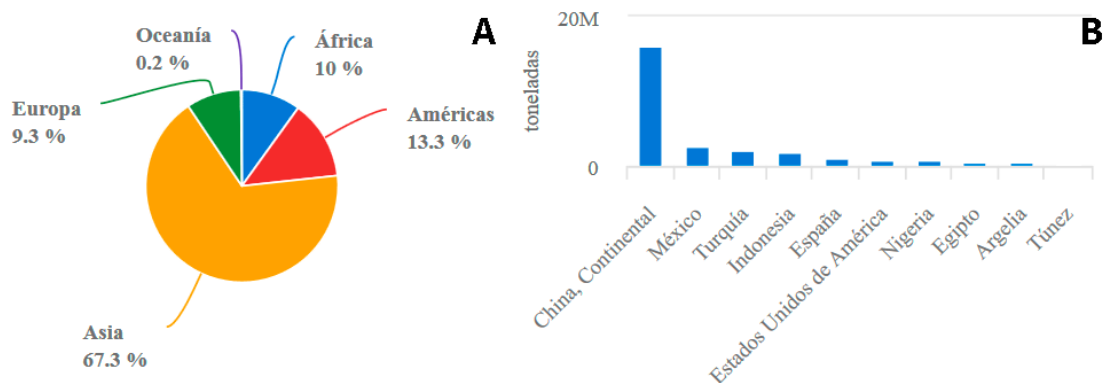


Figura 2: A) Diagrama de la producción mundial de pimiento (Fao.org, 2014). B) Países con la mayor producción de pimiento (Fao.org, 2014).

El pimiento llegó a España después del descubrimiento de América y su aceptación fue muy rápida ya que permitió sustituir a la costosa pimienta que se utilizaba hasta el momento. En el año 2014 la producción de pimiento en España fue de 1.133.453 toneladas, y España ocupó el quinto lugar de los países con mayor producción de pimiento del mundo (Figura 2B) (Fao.org, 2014). En la actualidad, el pimiento es el tercer cultivo hortícola atendiendo a producción total (precedido por el tomate y la cebolla) (Estrada et al., 2000).

1.1.2 Usos del pimiento

Gracias a la cantidad de variedades que existen, el pimiento se encuentra presente en la cocina de casi todos los países del mundo. Pueden consumirse frescos (como hortaliza), secos, asados (Figura 1F), en polvo, etc. Pero los pimientos tienen más usos que los estrictamente culinarios. Se utilizan también como plantas ornamentales (Figura 1E) gracias a sus vivos colores, y también se ha utilizado como planta medicinal para tratar enfermedades respiratorias o gastrointestinales (De, 2003).

1.1.3 Pimiento de Padrón

En Galicia, concretamente en la provincia de A Coruña se cultiva una variedad de pimiento perteneciente a la especie de *C. annuum* denominada “Pimiento de Padrón” (Figura 3). Se cree que esta variedad tiene su origen en unas semillas traídas a Galicia por los monjes Franciscanos en el siglo XVII. El fruto es una baya semicartilaginosa de color verde, y de color rojo en la senescencia. El tamaño y forma de los frutos varía según el grado de desarrollo en el que se encuentre y según las condiciones de cultivo. Hoy en día, esta variedad es altamente apreciada por los consumidores y por ello se cultiva en varias zonas, tanto dentro como fuera de Galicia (Estrada et al., 2000).



Figura 3: Pimiento de Padrón (draculina_ak 2008).

1.2 ENFERMEDADES DEL PIMIENTO

Las plantas, como muchos organismos, son susceptibles de ser atacadas por diversos patógenos. La infección por estos patógenos puede llegar a causar graves daños en la planta, e incluso su muerte. Por ello, las enfermedades causadas por estos organismos pueden provocar graves pérdidas económicas en los cultivos.

Los cultivos de pimiento son atacados por muchos organismos fitopatógenos, que causan grandes pérdidas en la producción. Entre los más comunes se encuentran *Phytophthora capsici*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea* (Díaz et al., 2005).

1.2.1 *Botrytis cinerea*

El género *Botrytis* consta actualmente de unas 30 especies, siendo *Botrytis cinerea* Pers.;Fr. (1794), la más estudiada de ellas. *B. cinerea* es un hongo filamentoso, patógeno de plantas. Su estilo de vida es necrotrofo (van Kan et al., 2014), lo que quiere decir que mata las células del huésped al que infecta mediante la secreción de toxinas y enzimas líticas. Tiene la capacidad de infectar a más de 200 especies de plantas de todo el mundo (incluso hay autores como Elad et al., (2015) que afirman que hasta 1400), al contrario que la mayoría de hongos patógenos, cuyo espectro de huésped suele ser limitado. Generalmente causa una enfermedad muy característica que se denomina ‘podredumbre gris’ (Elad et al., 2015). Sin embargo, la utilización adecuada de este hongo también tiene sus beneficios, se utiliza para la producción de algunos vinos, ya que en determinadas condiciones su infección sobre las uvas causa la

llamada ‘podredumbre noble’ (Dickinson, 2003). Los azúcares se concentran dentro de los frutos, y los vinos obtenidos son vinos dulces y de alto valor económico (Muntaloña, 1999).

Tiene varias estrategias de patogenicidad y por ello, y porque puede afectar a tal cantidad de especies es muy difícil de controlar. En 2002 el 10% del mercado mundial de fungicidas correspondía a aquellos dirigidos específicamente contra este patógeno (Dean et al., 2012)

1.2.1.1 Modo de infección

Para atacar la planta *B. cinerea* produce una serie de enzimas degradativas, toxinas y otros compuestos que debilitan el tejido vegetal, que utilizan luego para su crecimiento (van Kan, 2006). Williamson et al., (2007) afirman que este patógeno activa la muerte celular programada, de las células vegetales durante su ataque, y para ello genera metabolitos fitotóxicos, estallido oxidativo, ácido oxálico y toxinas selectivas de huésped (van Kan, 2006).

Entre sus modos de ataque incluye un comportamiento endófito en el que permanece quiescente en el tejido, lo que causa pérdidas después de la cosecha en algunos cultivos aparentemente sanos constituyendo un grave problema para los agricultores (Williamson et al., 2007).

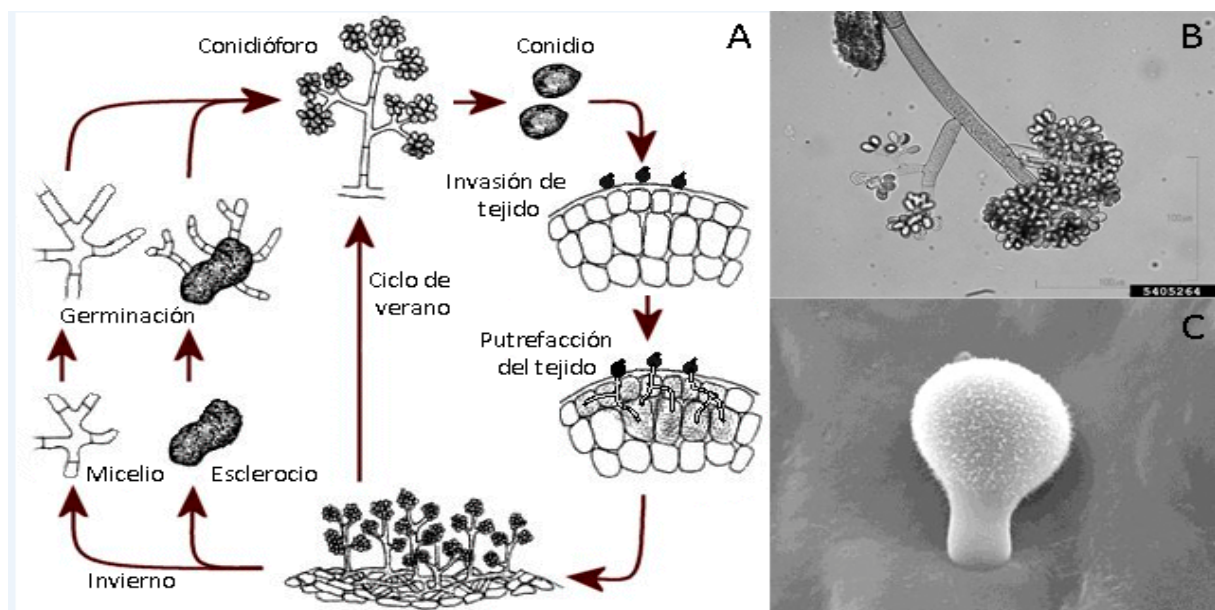


Figura 4: A) Representación del ciclo de vida de *B. cinerea*. Hacia la primavera, cuando las condiciones ambientales son óptimas, los conidios se desprenden del conidióforo y llegan a la superficie vegetal. Allí germinan y colonizan el tejido, que se pudre. A partir del tejido infectado los conidios pueden ser arrastrados por el agua o viento para infectar otros lugares. En invierno los esclerocios y el micelio se quedan sobre el tejido vegetal o en el suelo, y luego generan nuevos conidióforos y conidios, con la capacidad de infectar la cosecha (Biowikitec.wikidot.com, 2014). B) Conidióforo visto al microscopio electrónico de barrido (Paul Bachi s.a.). C) Conidio germinando visto al microscopio electrónico de barrido (Angel, M. s.a.).

Existen varias fuentes de inóculo primario, como los conidios generados por el micelio (Figura 4), los esclerocios o el propio micelio que sobrevive en los tejidos muertos de plantas infectadas o dentro de algunas semillas (Williamson et al., 2007). Además, los conidios también

pueden dispersarse por el viento (lo que ocurre en la mayoría de los casos (Elad et al., 2015)) entre cultivos vecinos, por el agua o por insectos (Elad, 2007).

Cuando los conidios del hongo entran en contacto con la planta se adhieren a ella de forma débil y luego germinan desarrollando un tubo germinativo (Dickinson, 2003). A partir de este tubo *B. cinerea* es capaz de generar una estructura común a muchas especies de hongos que se denomina apresorio. Sin embargo, el apresorio de *B. cinerea* no está sellado por una pared y por ello no es capaz de penetrar en la célula solamente mediante presión (Williamson et al., 2007). Esta estructura se sigue denominando apresorio por poseer una proteína homóloga a una proteína esencial para la función de los verdaderos apresorios (van Kan, 2006). Se cree que el apresorio de *B. cinerea* secreta una serie de enzimas capaces de degradar la superficie vegetal, y además genera H₂O₂ que ayuda en el proceso de rotura de la cutícula. Una vez que se rompe la cutícula, las hifas infecciosas del hongo comienzan a colonizar el interior de la planta. El éxito de la infección de *B. cinerea* parece ser el resultado de la combinación de la segregación de enzimas degradativas, la modificación del estado redox del huésped y la predisposición a la muerte celular programada que induce en las células vegetales (Ingle et al., 2015).

1.3 MÉTODOS DE DEFENSA DE LA PLANTA

1.3.1 Resistencia inducida

Las plantas no poseen células inmunes especializadas ni tienen la capacidad de escapar cuando se encuentran en condiciones adversas, deben estar defendiéndose ante los continuos ataques. Por ello tienen mecanismos de defensa con los que hacer frente a las condiciones adversas y al ataque de los patógenos. Estas defensas pueden ser activas o pasivas. Las pasivas pueden ser estructurales, que son cualquier modificación morfológica o anatómica que confiera ventaja a la planta, como protuberancias o cambios microscópicos en el espesor de la pared celular (deposición de ceras, lignina, suberina, etc.) que dificultan la entrada del patógeno a la célula (Hanley et al., 2007; Hammond-Kosack y Jones, 2015), o químicas, por ejemplo, la acumulación de sustancias tóxicas, como las fitoanticipinas o las proteínas PR.

Cuando un patógeno llega a la planta ésta desencadena una respuesta defensiva basal y reconoce, a través de receptores específicos llamados PRR (*Pattern Recognition Receptors*), los PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) en la superficie del patógeno. Esta respuesta se llama PTI (*PAMP-triggered immunity*) (Ingle et al., 2006). Pero hay algunos patógenos que consiguen esquivar esta respuesta mediante la generación de efectores que interfieren en el funcionamiento de la PTI. Estos efectores tienen la capacidad de hacer que la respuesta defensiva de la planta se vea comprometida.

Gracias a la coevolución entre planta y patógeno, existen algunas plantas que son capaces de responder a los efectores y defenderse. Este mecanismo se llama ETI (*Effector triggered immunity*), que es más fuerte y rápido que la PTI. Se encarga de la detección indirecta de los efectores gracias a unas proteínas llamadas proteínas R (Chisholm et al., 2006), que reconocen los efectores producidos por los patógenos. Además, la ETI suele ir acompañada de un proceso conocido como respuesta hipersensible, un tipo de muerte celular programada donde las células que se encuentran en el foco de la lesión mueren para que la infección no llegue al resto de la planta (Jones y Dangl, 2006).

Las respuestas activas o inducidas incluyen la respuesta hipersensible (que es activada a través de los receptores implicados en la ETI) y la inducción de genes como los implicados en las defensas estructurales de las paredes (como las peroxidasas, que están relacionadas con los procesos de lignificación), los implicados en la biosíntesis de fitoalexinas, o los implicados en la síntesis de enzimas hidrolíticas, proteínas PR y otras proteínas relacionadas con la defensa (Dickinson, 2003).

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos producidos por la planta que tienen bajo peso molecular y se acumulan rápidamente en zonas restringidas alrededor del sitio de infección (Hammond-Kosack y Jones, 2015). Esta acumulación de fitoalexinas resulta en la inhibición del crecimiento del patógeno. Entre ellas se incluyen derivados de las vías isoprenoide y

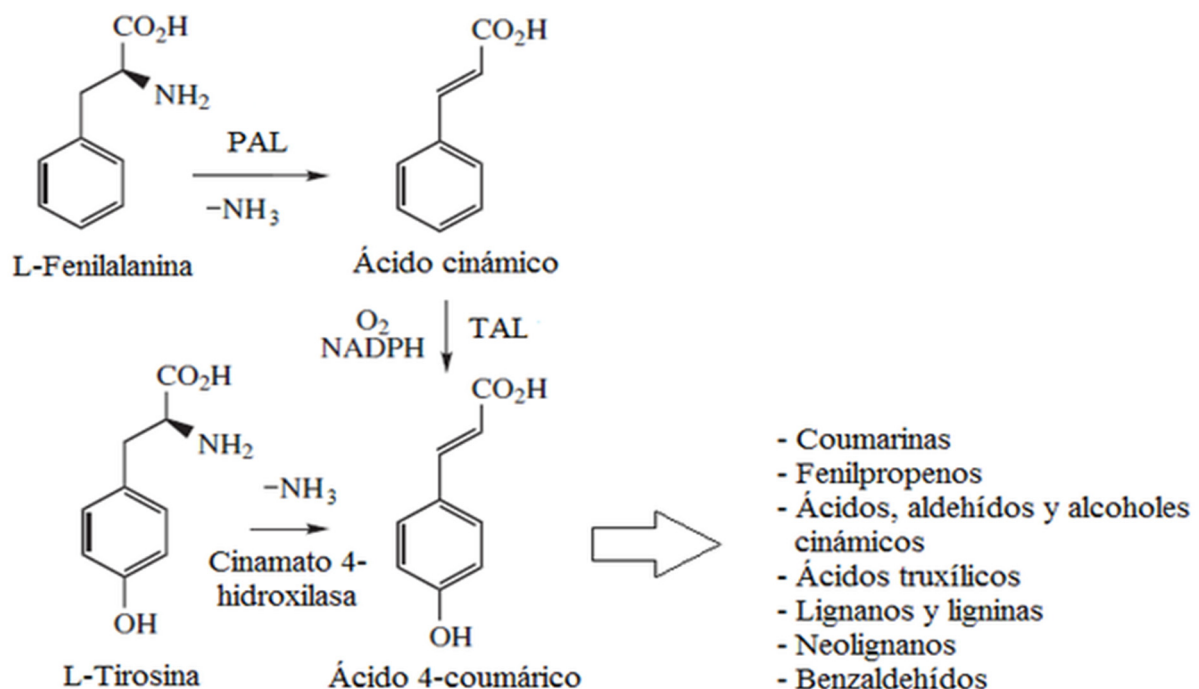


Figura 5: Ruta fenilpropanoide (Es.wikipedia.org, 2017).

fenilpropanoide (Figura 5) como los terpenoides, flavonoides o fenilpropanoides. Algunos genes que codifican enzimas importantes en estas vías, como la fenilalanina amonio liasa (PAL), se ven inducidos en respuestas defensivas asociadas con la respuesta hipersensible (Dickinson, 2003).

1.3.1.1 SAR e ISR

Existe también un tipo de defensa que ofrece resistencia a la infección secundaria frente a un amplio espectro de patógenos (Veloso et al., 2013) y que además se propaga por la planta llegando hasta tejidos distales al tejido infectado. Este tipo de defensa es conocido como SAR (Systemic Acquired Resistance), y confiere una resistencia duradera y eficaz frente a un amplio espectro de organismos (Durrant y Dong, 2004).

Para que la resistencia se propague por la planta es necesaria la acción de una señal móvil que se distribuya por el floema. Durante mucho tiempo se afirmó que esta señal móvil era el ácido salicílico (SA), pero varios autores afirman que la señalización podría ocurrir a través de la conversión de SA en un compuesto volátil, como el salicilato de metilo, o a través del glicerol 3-fosfato o del ácido azelaico (Durrant y Dong, 2004; Hammond-Kosack y Jones, 2015). En *Arabidopsis* y en *Nicotiana tabacum* se han encontrado dos rutas biosintéticas a partir de las cuales la planta puede sintetizar SA, la del isocorismato y la del ácido cinámico (Hammond-Kosack y Jones, 2015; Veloso et al., 2013). La aplicación exógena de SA puede imitar la activación de la SAR en ausencia de patógenos (Veloso et al., 2013).

Cuando el SA se acumula en los tejidos la proteína reguladora NPR1 migra hacia el núcleo, activa la transcripción de genes de defensa y la SAR se activa. Existen tres posibles receptores para SA dentro de la célula; NPR1, NPR3 y NPR4. Cuando no hay SA en las células NPR4, que es el receptor de mayor afinidad, provoca la degradación de NPR1 en el proteasoma. Cuando los niveles de SA son moderados se une a NPR4, y NPR1 queda libre de la degradación; si la cantidad de SA es tal que puede unirse a NPR1 además de a NPR4, se activa la transcripción de los genes de defensa. Cuando los niveles de SA son muy altos se une a los tres receptores a la vez, incluyendo a NPR3 que es el de menor afinidad. La unión a NPR3 provoca la degradación de NPR1 en el proteasoma y se activa la muerte celular programada de las células infectadas (Veloso et al., 2013).

La activación de la SAR (precedida por tanto por un incremento en los niveles de SA sistémico) se caracteriza por el aumento de la expresión de muchos genes relacionados con la patogénesis a nivel local y sistémico. Estos genes codifican proteínas PR (*Pathogenesis Related*) que se cree que contribuyen a la resistencia de la planta y que fueron descubiertas por Van Loon (1985). Existen varias proteínas PR diferentes, pero la función de muchas de ellas

aún se desconoce. La proteína PR-2 tiene actividad β -1,3-glucanasa, con funciones similares a las enzimas hidrolíticas que protegen a la planta de bacterias y hongos. Las proteínas PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11 tienen actividad quitinasa, e hidrolizan la quitina de las paredes celulares de los hongos. Las proteínas PR-9 tienen actividad peroxidasa y se relacionan con el refuerzo de la pared celular (Dickinson, 2003).

Además de la SAR existe otro tipo de resistencia inducida sistémica, la ISR (*Induced Systemic Resistance*). Estos dos tipos de defensa son similares, pero, mientras que la SAR es inducida por el ataque de un patógeno, la ISR es inducida por rizobacterias y por algunos hongos, ambos promotores del crecimiento de las plantas, que se denominan PGPR y PGPF respectivamente. Este tipo de resistencia parece ser la más eficaz contra patógenos necrotrofos. Depende de la señalización del ácido jasmónico y del etileno, pero es independiente de la señalización por SA y de las proteínas PR (van Loon, 2007).

A pesar de todos estos mecanismos de defensa de la planta, la resistencia que ofrece frente al ataque de un patógeno no es siempre la misma. Esta se ve influenciada por diversos elementos y/o por las condiciones en las que se encuentre la planta en el momento de ataque.

1.3.2 Elementos que pueden afectar a la inmunidad de las plantas

La inmunidad de la planta puede ser regulada por la luz, el ritmo circadiano, la temperatura o agentes inductores, entre otros.

En este trabajo nos vamos a centrar en el ritmo circadiano y en cómo afecta a la resistencia de la planta frente a organismos dañinos, y en la resistencia inducida por agentes de biocontrol.

1.3.2.1 Ritmo circadiano

Un factor que puede influir en la resistencia a patógenos es el ritmo circadiano (Roden e Ingle, 2009). El ritmo circadiano es un mecanismo interno del control del tiempo (Ingle et al., 2015) muy extendido en la naturaleza, que poseen la mayoría de los organismos (McClung, 2001) y que se establece por señales ambientales (Yakir et al., 2006).

El movimiento de rotación de la Tierra provoca cambios cíclicos que se producen cada 24h. Estos cambios se resumen en periodos de día y de noche, en aumento de temperatura, luz y descenso de humedad al amanecer y a la inversa al anochecer. Al sucederse estos cambios una y otra vez, sin descanso, los organismos pueden ser capaces de anticipar estos cambios y adaptar sus procesos internos para organizar muchas facetas de su desarrollo. Por ejemplo, la expresión de los genes que responden al frío es mayor en las primeras y en las últimas horas del día, cuando se dan las temperaturas más bajas (Bieniawska et al., 2008). Lo mismo ocurre con la transcripción de los genes de defensa, los niveles de expresión máxima se alcanzan en ciertos

momentos del día. El ritmo circadiano tiene un papel crucial, porque se encarga de que los genes se transcriban siempre en los momentos adecuados (Yakir et al., 2006). Los procesos biológicos de la planta se coordinan mediante estímulos externos para reaccionar de manera óptima a las condiciones ambientales. Las defensas de la planta deben ser moduladas para mitigar los costes que acarrea su activación, las plantas que muestran una expresión continua de las defensas crecen menos que las que no las expresan por los costos energéticos que exige la respuesta inmune (Karasov et al., 2017). Se coordinan temporalmente procesos biológicos con cambios ambientales (Sharma y Bhatt, 2014, Hua, 2013) para garantizar un equilibrio entre resistencia y crecimiento. El ritmo día-noche juega un papel fundamental en esta regulación modulando el crecimiento y la resistencia para producir una respuesta óptima a las condiciones ambientales. Por ello, las respuestas inmunológicas han de estar fuertemente equilibradas con otras funciones celulares (Wang et al., 2011). Así que es normal que las plantas tiendan a priorizar unos procesos sobre otros en los diferentes momentos del día.

Con esta información es fácil entender que el éxito del ataque producido por un patógeno en uno o en otro momento del día va a ser diferente (Hevia et al., 2015).

Es tal la importancia del ritmo circadiano que un estudio llevado a cabo por Covington et al. (2008) reveló que alrededor de un tercio de los genes de *Arabidopsis thaliana* están regulados por este reloj biológico. Hevia et al., (2015) afirman que los mecanismos de defensa estudiados en el organismo modelo *Arabidopsis thaliana* contra patógenos varían a lo largo del día, y que las lesiones producidas por la inoculación con *B. cinerea* en las hojas de la planta son menores cuando el ataque del hongo ocurre al amanecer. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ingle et al., (2015) que también afirman haber observado un aumento de la susceptibilidad de *A. thaliana* frente a *B. cinerea* a lo largo del día. Las plantas que ofrecieron menos resistencia fueron las inoculadas al anochecer. Los resultados obtenidos pueden deberse a que las plantas son capaces de anticipar una mayor probabilidad de infección en las primeras horas tras el amanecer (Ingle et al., 2015) debido al propio ritmo circadiano de los organismos patógenos. Se ha visto que muchas especies de hongos tienden a liberar sus esporas en momentos determinados del día. En concreto, la liberación de los conidios de *B. cinerea* tiene lugar por la mañana promovida por el aumento de temperatura y el descenso de la humedad (Williamson et al., 2007; Hevia et al., 2015).

Pero los resultados de la interacción planta-patógeno depende de la susceptibilidad del huésped y de la virulencia del patógeno, y estos parámetros pueden variar tanto con la etapa de desarrollo como con la hora del día (Roden e Ingle, 2009). Por ello, a la hora de estudiar cómo

influye el ritmo circadiano en la inmunidad es necesario tener en cuenta la especie huésped, la especie patógena y las condiciones en las que ambos se encuentran.

1.3.2.2 Resistencia inducida por agentes de biocontrol

Hace ya casi 100 años Chester, (1933) hablaba en su artículo “The problem of acquired physiological immunity in plants” sobre la resistencia inducida en plantas. Hace muchos años que se conoce que las plantas son capaces de adquirir resistencia frente a patógenos vegetales como virus, bacterias, nemátodos u hongos. Esta resistencia nunca es completa, sino que suele ser parcial (entre el 20 y el 85% (Walters et al., 2013)). Por ello, cuando observamos las lesiones de una planta inducida producidas por un patógeno lo que podemos esperar ver es un tamaño o número reducido de las lesiones causadas (Kuć, 1982).

Sin embargo, no todo depende de la planta, las condiciones ambientales y nutricionales en las que ésta se encuentre tienen mucho peso a la hora de efectuar una respuesta frente a un patógeno (Walters et al., 2013).

Para inducir resistencia en una planta es necesario exponerla a agentes inductores (bióticos o abióticos). Pero la capacidad para obtener plantas resistentes a partir de plantas susceptibles reside en que éstas ya poseen toda la información y los mecanismos necesarios para llevar a cabo una respuesta defensiva (Kuć, 1982). Pero si la planta ya posee la información genética y los mecanismos de defensa adecuados para defenderse de un patógeno ¿por qué necesita un inductor de resistencia para defenderse? Es verdad que los mecanismos de defensa son un punto clave en el proceso de protección frente a agentes infecciosos, pero si la planta no posee los medios para detectar la presencia del patógeno de forma rápida, la defensa no será eficaz y la planta será susceptible (Walters et al., 2007). La clave para que la planta pueda desencadenar una respuesta defensiva eficaz es que, después de ser tratada con un agente inmunizador, los mecanismos de defensa se activen en el momento y cantidad adecuados (Kuć, 1982).

La resistencia inducida puede ser local o sistémica. La resistencia inducida local es aquella en la que el tratamiento tiene lugar en la misma zona donde posteriormente va a tener lugar el encuentro con el patógeno. Por el contrario, si el tratamiento y el encuentro con el patógeno tienen lugar en diferentes zonas de la planta, estaremos hablando de resistencia inducida sistémica (Walters et al., 2007).

Existen muchos patógenos causantes de enfermedades en los cultivos, pero también existen varias maneras de combatirlos. En muchas ocasiones se utilizan químicos para mantener a estos organismos bajo control. Pero el uso masivo de estas sustancias químicas ha generado ciertas dudas y preocupaciones sobre su seguridad para el medioambiente o la salud. Por ello, en 2009 se estableció una Directiva (Dir. 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de

octubre de 2009) por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. En este contexto, se requieren medidas menos agresivas con el medio ambiente y más seguras. Actualmente se está implementando una estrategia que parece ser una buena opción para sustituir estos químicos por el uso de agentes de control biológico (Larena et al., 2003a). Estos agentes son organismos vivos, que se encargan de reducir, de forma natural, los efectos negativos en la planta provocados por los patógenos (Lucas, 2002). Un buen agente de biocontrol se caracteriza por no tener efectos adversos sobre el medioambiente o la salud de ningún organismo (incluidos los humanos), por ser efectivo, por ser capaz de sobrevivir en el ambiente en el que se encuentre y por otros aspectos que benefician su acción contra los patógenos vegetales (Murali et al., 2012). Además, al utilizar agentes de biocontrol en vez de químicos, existe una menor probabilidad de aparición de mecanismos de resistencia de los patógenos. Esto se debe a que como los agentes de control biológico son organismos vivos, tienen varios modos de acción diferentes, lo que hace más difícil la aparición de resistencias (Vázquez, 2013).

Los hongos fueron los primeros organismos que se utilizaron como agentes de biocontrol (Vázquez, 2013). Un ejemplo de hongo ampliamente utilizado como agente de biocontrol es el *Penicillium*.

1.3.2.2.1 *Penicillium* PO212

Penicillium rubens Currie y Thom (anteriormente conocido como *P. oxalicum*) es una de las especies de mayor distribución de todos los *Penicillium* (Vázquez, 2013).

La cepa 212 de *P. rubens* (PO212) es un hongo que se encuentra en el suelo (Vázquez et al., 2013) y es un buen agente de control biológico de varias enfermedades hortícolas (De Cal et al., 2000, Larena et al., 2003b) producidas por patógenos, incluidos patógenos fúngicos, que producen grandes pérdidas económicas (Villarino et al., 2015).

PO212 ha demostrado ser un agente de control biológico eficaz en un gran número de ensayos. De Cal et al., (2000) trataron plantas de tomate con *P. rubens* y luego las inocularon con *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. Este último organismo es un patógeno perteneciente al reino Fungi que causa grandes pérdidas económicas en las cosechas, por ello se requiere un agente de biocontrol que regule su infección. Demostraron que las plantas de tomate tratadas ofrecían una mayor resistencia a *Fusarium*, una reducción de la marchitez y de la colonización vascular por parte del patógeno.

Es necesario realizar más estudios de biocontrol debido a la necesidad de encontrar nuevos agentes que reemplacen el peligroso uso de los químicos. Como se ha visto, hay muchas

evidencias de que *Penicillium*, y en concreto *P. rubens* PO212 es un buen agente de biocontrol de algunos patógenos de plantas hortícolas. Por ello, sería interesante investigar si *P. rubens* PO212 es capaz de reducir los efectos dañinos provocados por *B. cinerea* en plantas de pimiento.

Así mismo sería muy interesante investigar cómo afecta el ritmo circadiano a la capacidad defensiva de *Capsicum annuum* ya que actualmente no existen datos sobre cómo afecta el ritmo circadiano en esta especie, la mayor parte de los estudios realizados en este campo se han llevado a cabo utilizando *A. thaliana* (Yakir et al., 2006).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Comprobar la capacidad de PO212 para inducir resistencia en las plantas de *C. annuum* frente a la infección por *B. cinerea*.
- Estudiar los efectos del ritmo circadiano de *C. annuum* sobre la resistencia a *B. cinerea*.
- Estudiar los efectos del ritmo circadiano de *C. annuum* sobre las actividades peroxidasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa, el contenido en fenoles y la expresión de los genes *CaPAL* y *CaPO1* a lo largo del día.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado para todos los experimentos consistió en plantas de la especie *Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón. Se sembraron varias bandejas con semillas, almacenadas en la nevera y procedentes del invernadero de la Universidade da Coruña, en un sustrato de vermiculita. Todas las plantas, salvo las de los experimentos de inmersión de la raíz y tratamiento con gotas, fueron trasplantadas a las dos semanas de edad a macetas de plástico individuales con un sustrato compuesto por una parte de perlita y tres de tierra. Las plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25 y 18°C respectivamente, durante todo el proceso de crecimiento. Las plantas tenían cuatro semanas de edad a la hora de realizar los experimentos.

3.2 MATERIAL FÚNGICO

El patógeno utilizado para todos los experimentos fue el aislado B₀₅₁₀ de *Botrytis cinerea* proporcionado por el Dr. J.A.L. van Kan, de la Wageningen University and Research (Países Bajos). Se cultivaron conidios de *B. cinerea* en placas de Petri con medio PDA (Patata Dextrosa

Agar). Los cultivos se renovaron aproximadamente cada semana y se mantuvieron durante todo el proceso en una cámara en oscuridad a una temperatura constante de 23°C.

El hongo utilizado para los experimentos de inducción de resistencia fue la cepa 212 de *Penicillium rubens* (PO212), proporcionada por la Dra. I. Larena, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, (Madrid). Los conidios de este hongo se encontraban almacenados en la nevera.

3.3 MÉTODO DE TRATAMIENTO CON PO212

El tratamiento con PO212 se realizó de tres formas diferentes; mediante inmersión de las raíces de la planta en una suspensión de conidios, mediante la aplicación de gotas de la suspensión sobre las hojas de la planta y mediante pulverización de la suspensión sobre las hojas de pimiento.

La suspensión de conidios de PO212 se preparó en una solución nutritiva de Hoagland y Arnon (1950) estéril, a una concentración de $1,6 \times 10^6$ conidios por ml.

La suspensión se dejó dos horas en agitación en un agitador a 150 r.p.m. antes de iniciar los tratamientos. Se hizo lo mismo con idéntico volumen de solución nutritiva estéril, que se utilizó para tratar los grupos control.

3.3.1 Tratamiento mediante inmersión de las raíces

Después de las dos horas de agitación se procedió al tratamiento de dos grupos de ocho plantas cada uno. Las raíces de las plantas fueron sumergidas en 100ml de la suspensión. Se sumergieron también las raíces de dos grupos de ocho plantas en solución nutritiva estéril. Todas las plantas se mantuvieron así, durante 24 horas, en la cámara de cultivo.

Pasadas las 24 horas se procedió a cambiar las plantas a recipientes con solución nutritiva estéril, y se mantuvieron en la cámara durante 48 horas, tras las cuales fueron inoculadas con el patógeno.

Se realizaron tres experimentos independientes.

3.3.2 Tratamiento mediante gotas en las hojas

Se colocaron 16 plantas individualmente en tubos transparentes con 10ml de solución nutritiva estéril y se separaron en dos grupos iguales. Uno de los grupos fue tratado con la suspensión de conidios de PO212 y el otro fue tratado de la misma forma, pero con solución nutritiva y sirvió como grupo control. El método de tratamiento consistió en colocar seis gotas de 5µl cada una, en una de las dos primeras hojas verdaderas de la planta. Las plantas se dejaron en la cámara de cultivo durante 24 horas y después fueron inoculadas con el patógeno.

Se realizó un único experimento.

3.3.3 Tratamiento mediante la pulverización de las hojas

Se seleccionaron diez plantas de pimiento y se dividieron en dos grupos iguales. Uno de los grupos fue tratado con la suspensión de conidios y el otro fue tratado con solución nutritiva y sirvió como control.

Para este tratamiento se utilizó un tubo falcon y un pulverizador. El tubo falcon se llenó hasta un volumen de 10ml de la mezcla correspondiente y a continuación se pulverizaron el haz y el envés de las dos primeras hojas verdaderas de cada planta. Luego se dejaron las plantas en la cámara de cultivo durante 24 horas para luego ser inoculadas con el patógeno.

Se realizaron dos experimentos independientes.

3.4 MÉTODO DE INOCULACIÓN CON *BOTRYTIS CINEREA*

La inoculación con *B. cinerea* se realizó a las 11a.m., a partir de conidios cultivados en placas de cultivo. Con la ayuda de un sacabocados, previamente esterilizado con alcohol y fuego, de 5mm de diámetro se realizaron cortes circulares que consistían en medio de cultivo y micelio. Se colocó un disco de micelio en cada una de las dos primeras hojas verdaderas. Una vez colocados todos los discos con la parte del micelio en contacto con la hoja se procedió a guardar los grupos de plantas en cajas con tapa, y con un poco de agua en el fondo para mantener la humedad. Las cajas se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente hasta que se realizaron todas medidas necesarias.

3.5 MÉTODO DE MEDIDA DE LAS LESIONES OCASIONADAS POR *BOTRYTIS CINEREA*

Las lesiones causadas por *B. cinerea* se midieron con la ayuda de un calibre digital con una precisión de $\pm 0,01$ mm. En los experimentos del ritmo circadiano se realizaron las medidas de las lesiones a las 48 horas tras la inoculación. En el resto de experimentos se realizaron medidas a las 48 horas tras la inoculación.

Se anotaron las medidas de las lesiones y las lesiones no expandidas (aquellas cuya medida más larga era inferior a 5mm, que es la medida del diámetro del disco de micelio). A partir de los datos de diámetro se calculó el área de las lesiones y se estimó el área con síntomas por planta.

3.6 EXPERIMENTO DEL RITMO CIRCADIANO

Para el experimento del ritmo circadiano se recogieron plantas a diferentes horas del día, estas plantas sirvieron para dos propósitos.

Se inocularon cinco plantas en cada hora establecida con *B. cinerea* (la inoculación y evaluación de síntomas se realizaron del mismo modo que para los experimentos de PO212, pero con dos discos de micelio por hoja en vez de uno) para observar el efecto sobre la resistencia al patógeno. Se realizaron tres experimentos independientes.

Otras plantas, tres de cada vez, se utilizaron para medir diferentes parámetros de defensa de la planta. La recogida de muestras se indica en el siguiente apartado. Se realizaron entre 3 y 5 experimentos independientes, dependiendo del parámetro analizado.

Las horas de inoculación o recogida fueron siempre las 9, 13, 17 y 21h. En estos momentos las plantas llevaban en luz diferentes horas, ya que se encontraban en un fotoperiodo de 16h de duración. La luz comenzaba todos los días a las 8a.m., por lo que las plantas inoculadas o recogidas llevaban 1h, 5h, 9h y 13h de luz respectivamente, como se indica en la Figura 6.

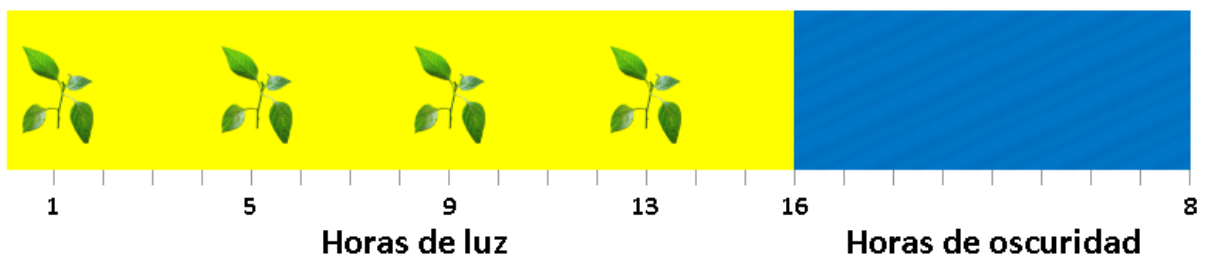


Figura 6: Esquema que ilustra las horas de luz que tenía cada grupo de plantas en el momento de la recogida.

3.7 MÉTODO DE RECOGIDA Y PULVERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se recogieron muestras de tejido vegetal para estudiar los efectos del ritmo circadiano sobre varios componentes de la planta. Las muestras se recogieron a las 9, 13, 17 y 21h.

Cada muestra estaba constituida por las dos primeras hojas verdaderas de tres plantas, y las muestras se congelaron y almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Posteriormente se procedió a la pulverización de las muestras en nitrógeno líquido en un mortero estéril. Se machacaron las hojas sin dejar que se descongelaran y con ayuda de una cucharilla fría se fueron llenando tubos con el polvo resultante. Se llenaron dos tubos eppendorf con 60mg de muestra cada uno para estudiar la expresión génica. Se llenó un tubo con 500mg de muestra para estudiar proteínas. El resto de la muestra se recogió en otros dos tubos y se utilizó para estudiar la cantidad de fenoles.

Inmediatamente después de llenar los tubos éstos fueron sumergidos en el nitrógeno líquido y luego fueron almacenados a -80°C hasta su utilización sin romper en ningún momento la cadena de frío para evitar degradaciones del material vegetal.

3.8 MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y MEDIDA DE LOS FENOLES

Para la extracción de los fenoles se utilizaron los tubos de muestra correspondientes y su contenido se pasó a un tubo transparente. Posteriormente se añadieron 5ml de metanol al 80%, se mezcló todo y se incubó en un bloque térmico a 70°C durante 15 minutos.

Después de la incubación se enfrió el tubo en hielo durante dos o tres minutos y se centrifugó a 1500 xg durante diez minutos. Se recogió el sobrenadante en un tubo graduado de 10ml con cuidado de no recoger el precipitado. Se añadieron 5ml más de metanol al 80% en el tubo y se volvió a centrifugar a 1500 xg durante diez minutos. Tras la centrifugación se volvió a recoger el sobrenadante y se mezcló con el sobrenadante anterior. Tras esto, se enrasó la mezcla a 10ml con más metanol al 80%. Se mezcló bien el contenido del tubo graduado, se pasó a un tubo transparente y se almacenó en la nevera.

Para la medida de los fenoles se utilizó el método de Singleton y Rossi (1965). Se mezclaron 50µl de la muestra de extracción de fenoles, 750µl de agua destilada y 50µl de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se agitó el tubo y se incubó tres minutos a temperatura ambiente. Luego se añadieron 150µl de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 20%. Se agitó el tubo y se dejó incubando a temperatura ambiente durante dos horas. Transcurrido ese tiempo se procedió a realizar la medida de la absorbancia a 760nm en el espectrofotómetro.

Para poder determinar la cantidad de fenoles fue necesario utilizar una recta de calibrado que se había preparado anteriormente utilizando diferentes soluciones con 0,01, 0,02, 0,05 y 0,1 mg de ácido gálico (un ácido fenólico) por ml de metanol al 80%.

La cantidad de fenoles se expresó en mg/g de material vegetal, y a la hora de analizar los datos, los mg/g se expresaron en porcentaje respecto a las 9h.

La medida de los fenoles de cada muestra se realizó por triplicado y se realizaron cinco experimentos independientes.

3.9 MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y MEDIDA DE LAS PROTEÍNAS TOTALES

En un tubo de 2ml se mezclaron bien 2ml de tampón Tris HCL 50mM + KCl 1M con un pH de 7,5 con 25mg de Polivinilpirrolidona (PVPP). A esta mezcla se añadieron los 500 mg de la muestra conservada en frío y se centrifugó a 12857 xg durante 20 minutos y a 4°C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante en un tubo graduado y se enrasó a un volumen de entre 2,6 y 2,9ml. Se colocaron las muestras en hielo y se vertieron 2,5ml de muestra en una columna Sephadex G-20625 PD-10, previamente lavada con 25ml de tampón Tris HCl 50mM con un pH de 7,5 para desalarlas. Una vez desaladas, las muestras se almacenaron en alícuotas

a -80°C. Estas alícuotas sirvieron para realizar las posteriores medidas de proteínas totales, actividad peroxidasa, actividad glucanasa y actividad quitinasa.

Para la medida de las proteínas totales se mezclaron 900µl de reactivo de Bradford, 50µl de hidróxido de sodio (NaOH), 30µl de muestra y 20µl de agua destilada. La mezcla se incubó cinco minutos en oscuridad y a temperatura ambiente y a continuación se midió la absorbancia a 590nm en el espectrofotómetro.

Las medidas de cada muestra se hicieron por triplicado y se realizaron cuatro experimentos independientes.

3.10 MÉTODO DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA

Para medir la actividad peroxidasa se utilizó una de las alícuotas conservadas a -80°C. Se descongeló mediante inmersión en agua destilada y luego se centrifugó a 16060 xg un minuto. Una vez hecho esto, la muestra se conservó en hielo.

En una cubeta de espectrofotómetro se mezclaron 915µl de tampón Tris HCL 50mM pH 7,5 a temperatura ambiente, 10µl de 4-metoxi-1-naftol 100mM y 25µl de muestra. Inmediatamente después se agitó el contenido y se añadieron 50µl de peróxido de hidrógeno 10mM. Se mezcló de nuevo el contenido y se midió la absorbancia a 593nm durante tres minutos.

La actividad peroxidasa se calculó en unidades internacionales (U) por mg de proteína. A la hora de analizar los resultados, se expresaron los datos en porcentaje respecto a las 9h.

Cada medida se hizo por triplicado y se realizaron cuatro experimentos independientes.

3.11 MÉTODO DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD B-1,3-GLUCANASA

Para realizar la medida de la actividad β-1,3-glucanasa se partió de una de las alícuotas almacenadas a -80°C. Se descongeló y luego se centrifugó a 16060 xg durante un minuto.

Se mezclaron 332,5µl de tampón acetato sódico 100mM pH 5 con 82,5µl de laminarina al 1% y se incubó la mezcla a 37°C durante diez minutos en un bloque térmico. Transcurrido ese tiempo se añadieron 85µl de la muestra y tras agitar se incubó de nuevo a 37°C durante diez minutos. Después se incubó la mezcla en hielo durante cinco minutos, y luego se añadieron 670µl de ferricianuro potásico 1,5mM en carbonato sódico 0,5M conservado en oscuridad. Se incubó la muestra durante 15 minutos a 100°C. Luego se incubó cinco minutos en hielo y se midió la absorbancia a 420nm en el espectrofotómetro.

La actividad glucanasa se calculó en miliunidades internacionales (mU) por mg de proteína. Una unidad de actividad β-1,3-glucanasa se define como la cantidad de enzima que produce 1µmol de azúcares reductores por minuto. A la hora de analizar los resultados, se expresaron

los datos en porcentaje respecto a las 9h. Las medidas de la actividad β -1,3-glucanasa se realizaron por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes.

3.12 MÉTODO DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD QUITINASA

Para realizar la medida de la actividad quitinasa también se partió de la misma alícuota que para medir la actividad β -1,3-glucanasa, se descongeló en agua destilada y luego se centrifugó a 16060 xg durante un minuto.

Se añadieron 332,5 μ l de tampón acetato sódico 100mM pH 5 y 82,5 μ l de glicol-quitina al 1%. Se realizó una incubación en un bloque térmico a 37°C durante diez minutos. Luego se añadieron 85 μ l de la muestra y tras agitar se incubó de nuevo a 37°C durante diez minutos. Después se metió el eppendorf en un baño de hielo durante cinco minutos, y luego se añadieron 670 μ l de Ferricianuro potásico 1,5mM en carbonato sódico 0,5M conservado en oscuridad. Se incubó el tubo durante 15 minutos a 100°C, y luego se incubó cinco minutos en hielo. Por último, se midió la absorbancia a 420nm en el espectrofotómetro.

La actividad quitinasa se calculó en miliunidades internacionales (mU) por mg de proteína. Una unidad de actividad quitinasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de azúcares reductores por minuto. A la hora de analizar los resultados, se expresaron los datos en porcentaje respecto a las 9h.

Las medidas de la actividad quitinasa se realizaron por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes.

3.13 MÉTODO DE MEDIDA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para medir la expresión génica fue necesario obtener el RNA de la planta, sintetizar el cDNA utilizando el RNA extraído como molde y realizar una qPCR para analizar la expresión génica.

3.13.1 Método de extracción de RNA

El RNA vegetal se obtuvo siguiendo el protocolo del “E.Z.N.A.® Plant RNA Kit” de Omega Biotek. Luego se midió la absorbancia de RNA a 260 y 280nm en el espectrofotómetro para saber la cantidad de RNA obtenida.

3.13.2 Método de síntesis de cDNA

Para sintetizar el cDNA se siguió el protocolo del “iScript cDNA Synthesis Kit” de Bio-Rad. Por último, se almacenó el cDNA a -20°C hasta el análisis de expresión génica.

3.13.3 Método para la qPCR

El análisis de expresión génica realizó mediante una qPCR llevada a cabo en el SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de la Coruña, desde donde nos enviaron los resultados correspondientes.

Las muestras de cDNA se analizaron con el Biorad iCycler™iQ System. Se evaluó la expresión génica de dos genes: una peroxidasa (*CaPOI*) y una fenilalanina amonio liasa 1 (*CaPAL1*). Como gen de referencia se usó la actina (*CaACT*). Los cebadores usados para la amplificación se indican en la Tabla 1. Las condiciones en las que se desarrolló la qPCR fueron 2 min de desnaturalización a 95°C seguida de 40 ciclos de amplificación (cada ciclo consta de 20 s a 95°C, 25 s a 58°C y 50 s a 72°C).

El análisis de los datos se realizó con el Biorad Optical System Software 3.0. Se calculó la eficiencia y los valores Ct (*Cycle threshold*) obtenidos y se procesaron mediante el método de Pfaffl (2001) para obtener los valores de expresión relativa. Este método define la expresión relativa como:

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

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

Tabla 1: Cebadores empleados en los estudios de expresión génica por qPCR en tiempo real.					
			Cebador		
Gen	Nº Acceso	Referencia	Nombre	Secuencia	Amplicón
<i>CaPOI</i>	AF442386	García et al. (2015)	<i>CqPOIFW</i>	5' ACACTGGAAGCGTGAACAAT 3'	333 pb
			<i>CaPOIRV</i>	5' CAGCTTGCGCTAACATGAAC 3'	
<i>CaPAL1</i>	KF279696	García (2015) (tesis de licenciatura)	<i>CaFPAL1c</i>	5' GTGGCACGATCACTGCCTCG3'	319 pb
			<i>CaRPAL1c</i>	5'TGGTCCGTGAACTCGGGCTT3'	
<i>CaACT</i>	AY572427	Silvar et al. (2008)	<i>CaACTFW</i>	5'ATCCCTCCACCTCTTCACTCTC3'	128 bp
			<i>CaACTRV</i>	5'GCCTTAACCATTCTGTTCATTAT C3'	

A la hora de analizar los resultados de expresión génica, se expresaron los respecto a las 9h.

3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de todos los datos se llevó a cabo mediante los programas Excel 2016 y STATGRAPHICS Centurion XVI para Windows. Todos los datos de las medidas de las lesiones producidas por *B. cinerea* fueron analizados con una t-Student, salvo las del experimento del ritmo circadiano, en las que se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. El análisis de los datos de fenoles, actividad peroxidasa, β -1,3-glucanasa, quitinasa y de la expresión génica se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis y un análisis post-hoc basado en los intervalos de la representación de cajas y bigotes.

4. RESULTADOS

Experimentos de inducción de resistencia por PO212 en *C. annuum*

Efecto del tratamiento con PO212 por la raíz sobre la resistencia frente a *B. cinerea*

Se midió el diámetro de las lesiones causadas por *B. cinerea* en *C. annuum* tras el tratamiento por la raíz con PO212 y se compararon con las lesiones medidas en plantas control (Figura 7). Las medidas se realizaron 48 horas después de la inoculación con el patógeno. Al comparar las áreas con síntomas por planta, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (t-Student, $p=0,1139$).

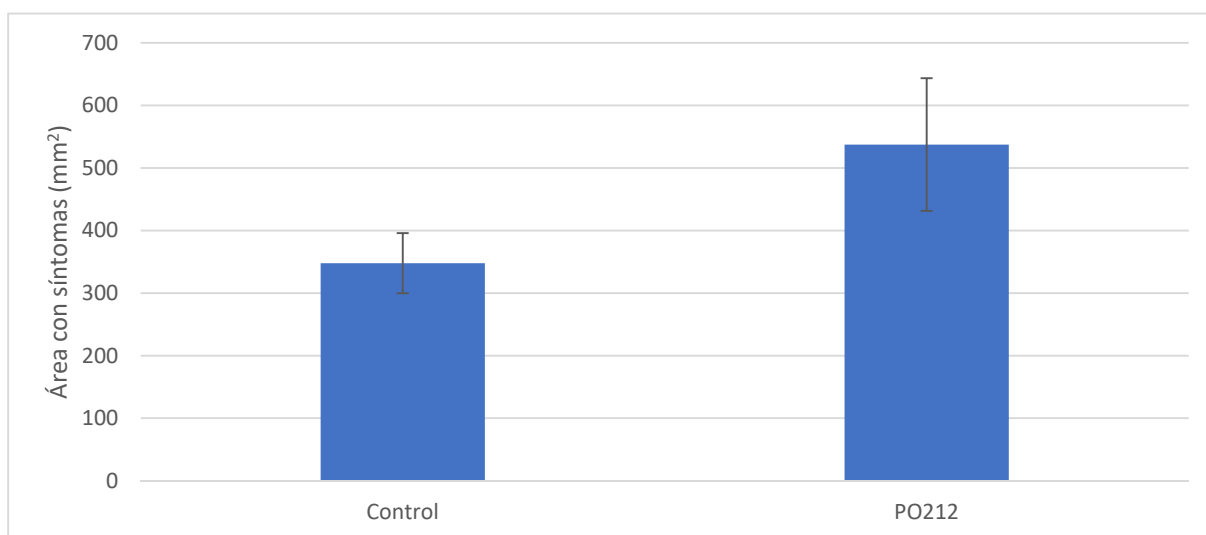


Figura 7: Efecto del tratamiento con PO212 por la raíz sobre la resistencia frente a *B. cinerea*. Se muestra la media \pm el error estándar.

Por lo tanto, la inducción de PO212 por la raíz de *C. annuum* no parece producir resistencia frente a la infección con el patógeno.

Efecto del tratamiento con PO212 por gotas en las hojas sobre la resistencia frente a *B. cinerea*

Se realizaron medidas, a las 48h tras la inoculación con el patógeno, de los diámetros de las lesiones causadas por *B. cinerea* en plantas de pimiento tras el tratamiento con PO212 mediante la aplicación de gotas en las hojas y en plantas control. Comparando las áreas por planta no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (t-Student, $p=0,5693$) (Figura 8).

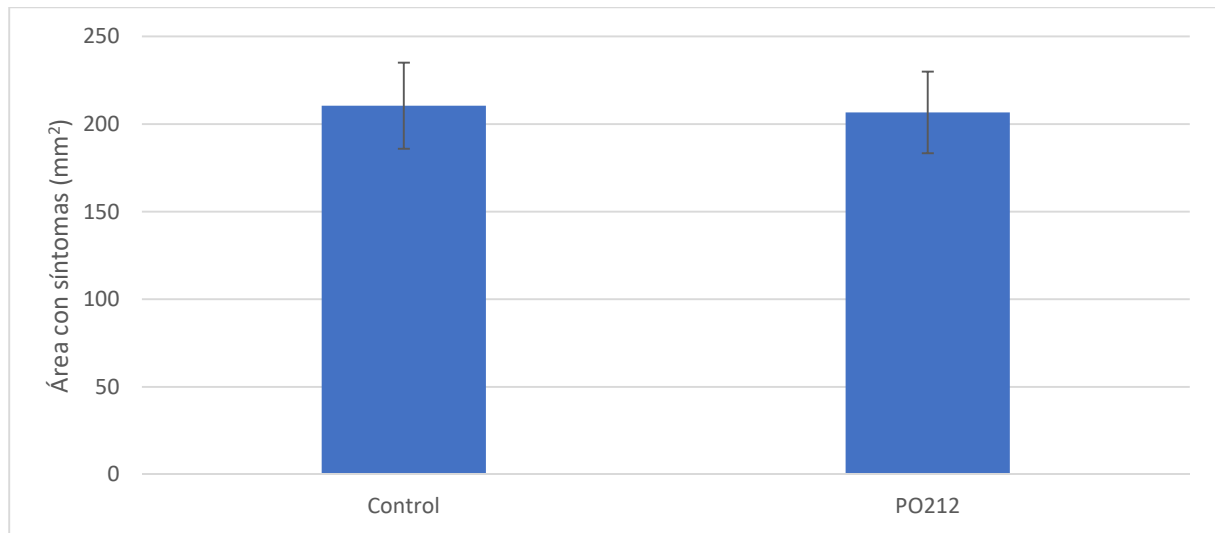


Figura 8: Efecto del tratamiento con PO212 por gotas en las hojas sobre la resistencia frente a *B. cinerea*. Se muestra la media \pm el error estándar.

Por lo que parece que la inoculación con PO212 por gotas en las hojas de pimiento tampoco induce resistencia frente a *B. cinerea*.

Efecto del tratamiento con PO212 por pulverización de las hojas sobre la resistencia frente a *B. cinerea*

Tras la pulverización de las hojas con PO212 se inocularon con discos de micelio de *B. cinerea* y se midieron los diámetros de las lesiones producidas (de estas plantas y de un grupo control) a las 48h post-inoculación. Al comparar las áreas con síntomas del grupo tratado y del control, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (t-Student, $p=0,7026$) (Figura 9).

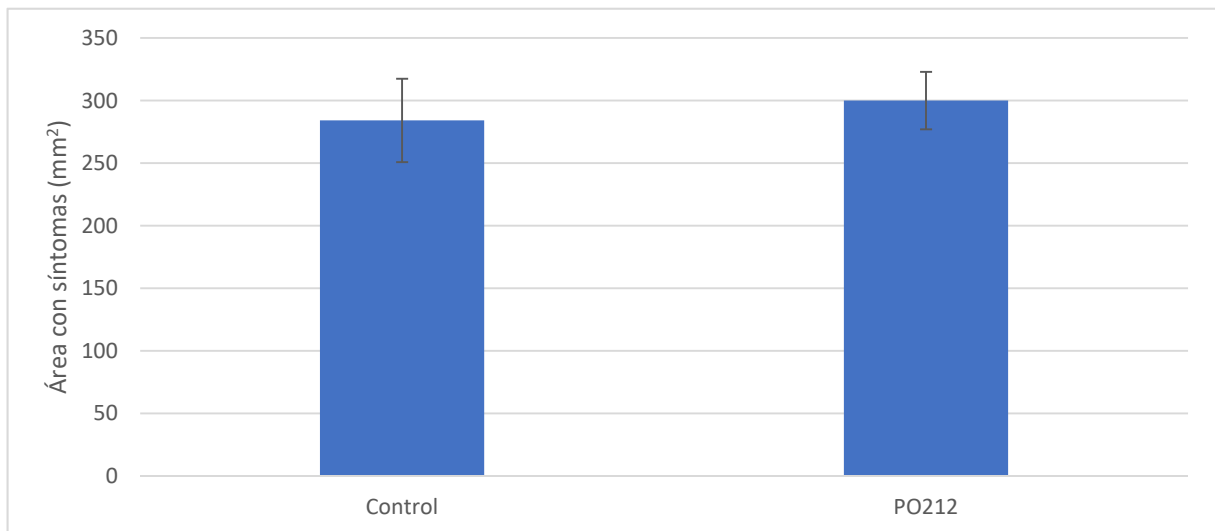


Figura 9: Efecto del tratamiento de las hojas por pulverización con PO212 sobre la resistencia frente a *B. cinerea*. Se muestra la media \pm el error estándar.

El tratamiento con PO212 a través de la pulverización de las hojas, de nuevo, parece no tener efecto en la resistencia de las plantas al patógeno elegido.

Experimentos del ritmo circadiano

Efecto del ritmo circadiano sobre la resistencia frente a *B. cinerea*

Se inocularon plantas de pimiento con *B. cinerea* a las 9h, 13h, 17h y 21h. Las medidas de las lesiones se realizaron a las 48h tras la inoculación. Al comparar las áreas con síntomas por planta, se observó una tendencia de reducción del área a medida que avanza el día (Figura 10). Las plantas que fueron inoculadas a las 21h (cuando llevaban 13h de luz) presentan una reducción de la lesión del 38,23% frente a las inoculadas a las 9h (cuando llevaban 1h de luz). Al comparar las áreas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las 9h y las 13h, pero sí entre estas y las 17h y 21h (ANOVA y LSD de Fisher $p=0,0327$) con un nivel de confianza del 95%.

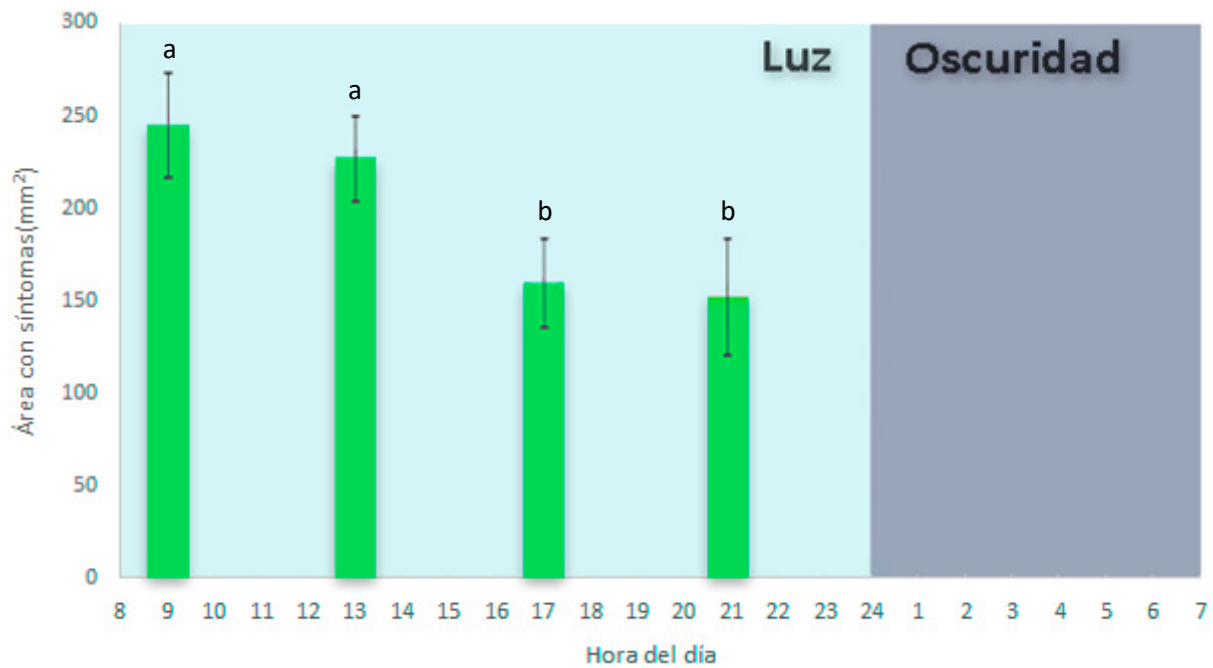


Figura 10: Efecto del ritmo circadiano sobre la resistencia frente a *B. cinerea*. Se muestra la media \pm el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos.

Esto sugiere que las plantas de pimiento ofrecen mayor resistencia a *B. cinerea* cuando llevan varias horas de luz. Por el contrario, cuando llevan pocas horas de luz son más susceptibles a la infección.

Efecto del ritmo circadiano sobre la cantidad de fenoles en las hojas

Se midió la cantidad de fenoles presentes en las hojas de pimiento a las 9h, 13h, 17h y 21h. Los datos recogidos presentan un descenso en el contenido en fenoles a medida que avanza el día (Figura 11). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p=0,0371$) con un nivel de confianza del 95% entre las 9h y el resto de horas. Las cantidades mayores de fenoles se encuentran a las 9 de la mañana, siendo menores cuando la planta había recibido más horas de luz.



Figura 11: Efecto del ritmo circadiano sobre la cantidad de fenoles en las hojas de pimiento. Se muestra la media \pm el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos.

Efecto del ritmo circadiano sobre la actividad peroxidasa en las hojas

Se midió la actividad peroxidasa de las hojas de pimiento a varias horas del día: 9h, 13h, 17h y 21h. Los datos obtenidos presentaron un descenso de la actividad peroxidasa a medida que avanza el día (Figura 12). Al comparar los datos de la actividad peroxidasa de las diferentes horas se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las 9h y el resto de horas (Kruskal-Wallis, $p = 0,0289$) con un nivel de confianza del 95%. Cuando la planta lleva menos horas de luz presenta los datos de actividad peroxidasa más altos.

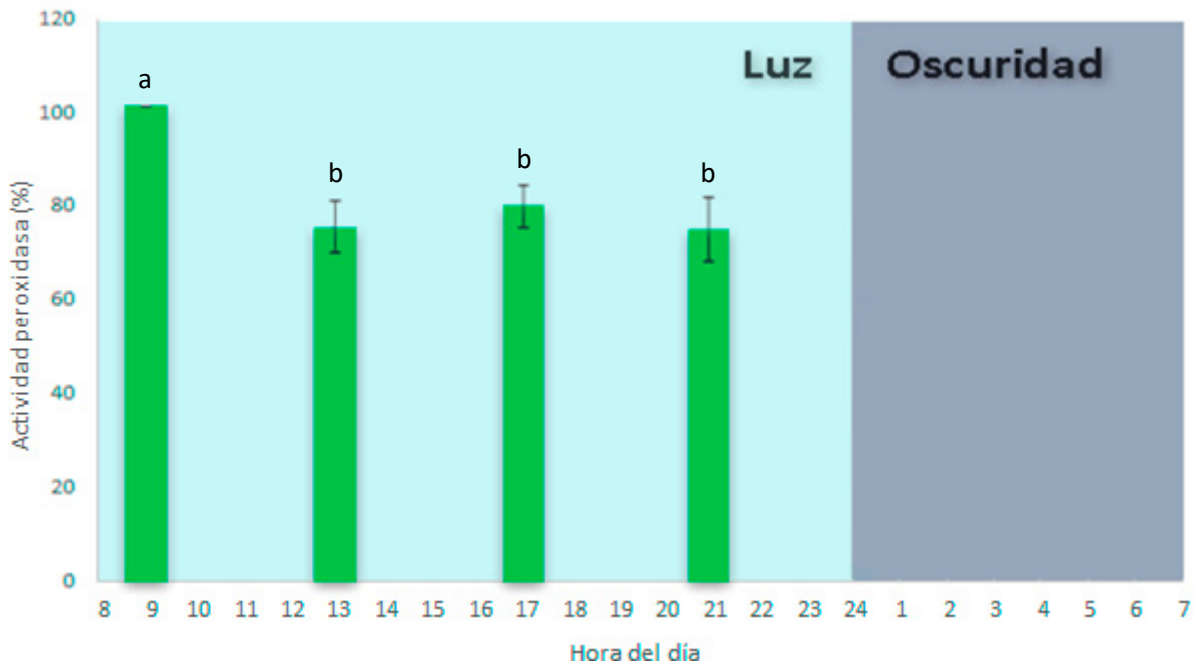


Figura 12: Efecto del ritmo circadiano sobre la actividad peroxidasa en las hojas de pimienta. Se muestra la media \pm el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos.

Efecto del ritmo circadiano sobre la actividad glucanasa en las hojas

Se midió la actividad β -1,3-glucanasa de las hojas de *C. annuum* a varias horas del día (9h, 13h, 17h y 21h). Al analizar los datos de la Figura 13 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,8629$).

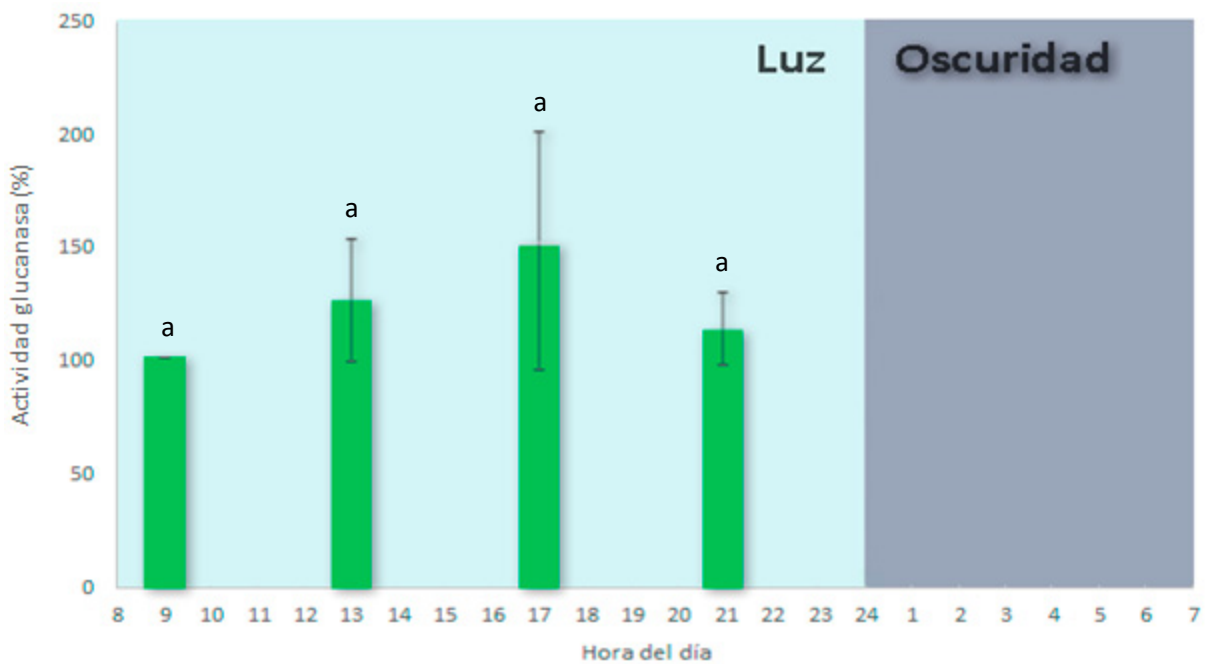


Figura 13: Efecto del ritmo circadiano sobre la actividad glucanasa en las hojas de pimienta. Se muestra la media \pm el error estándar. Las letras indican que no hay diferencias significativas.

Efecto del ritmo circadiano sobre la actividad quitinasa en las hojas

Se midió la actividad quitinasa de las hojas de pimiento a las 9h, 13h, 17h y 21h (Figura 14). Analizando los datos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos (Kruskal-Wallis, $p= 0,7764$).

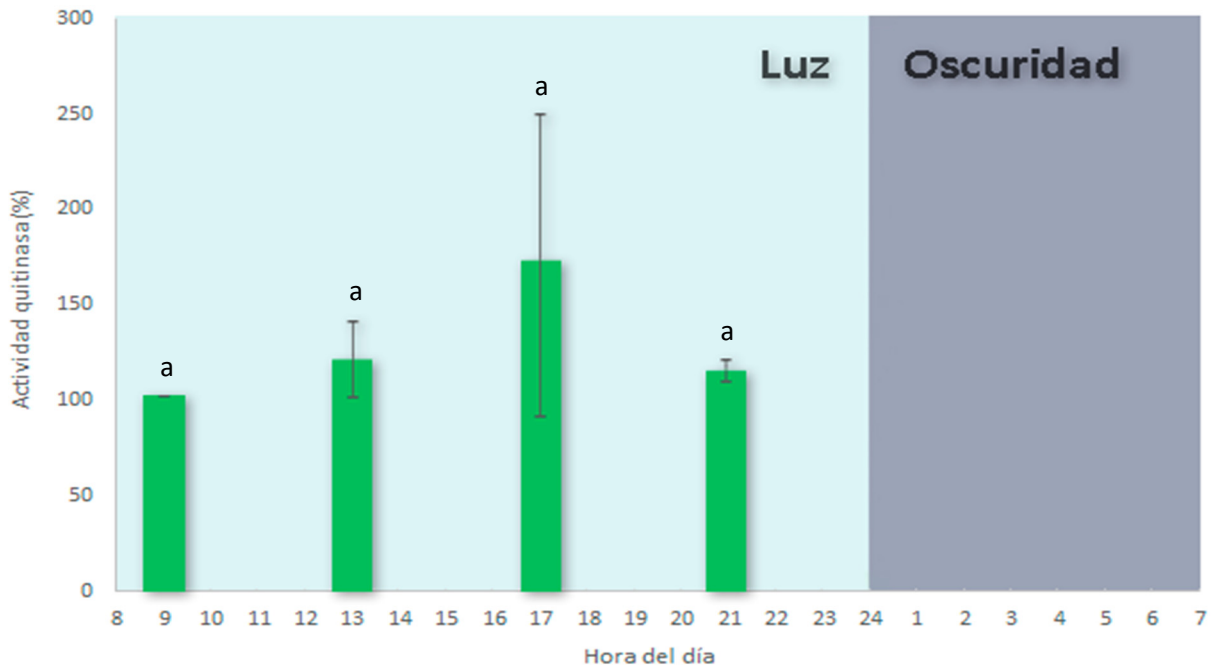


Figura 14: Efecto del ritmo circadiano sobre la actividad quitinasa en las hojas de pimiento. Se muestra la media \pm el error estándar. Las letras indican que no hay diferencias significativas.

Efecto del ritmo circadiano sobre la expresión génica de *CaPAL* en las hojas

Se realizó una cuantificación del nivel de expresión génica del gen *CaPAL* de las hojas de pimiento a las 9h, 13h, 17h y 21h. En la Figura 15 se observa una caída de los niveles de expresión a lo largo del día. Los niveles de mayor expresión se dan a las 9h y los de menor expresión a las 17 h y 21h.

Al comparar los datos de los niveles de expresión de *CaPAL* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las 9h y 13h, pero sí al comparar estas con las 17h y 21h (Kruskal-Wallis, $p= 0,0954$) con un nivel de confianza del 90%.

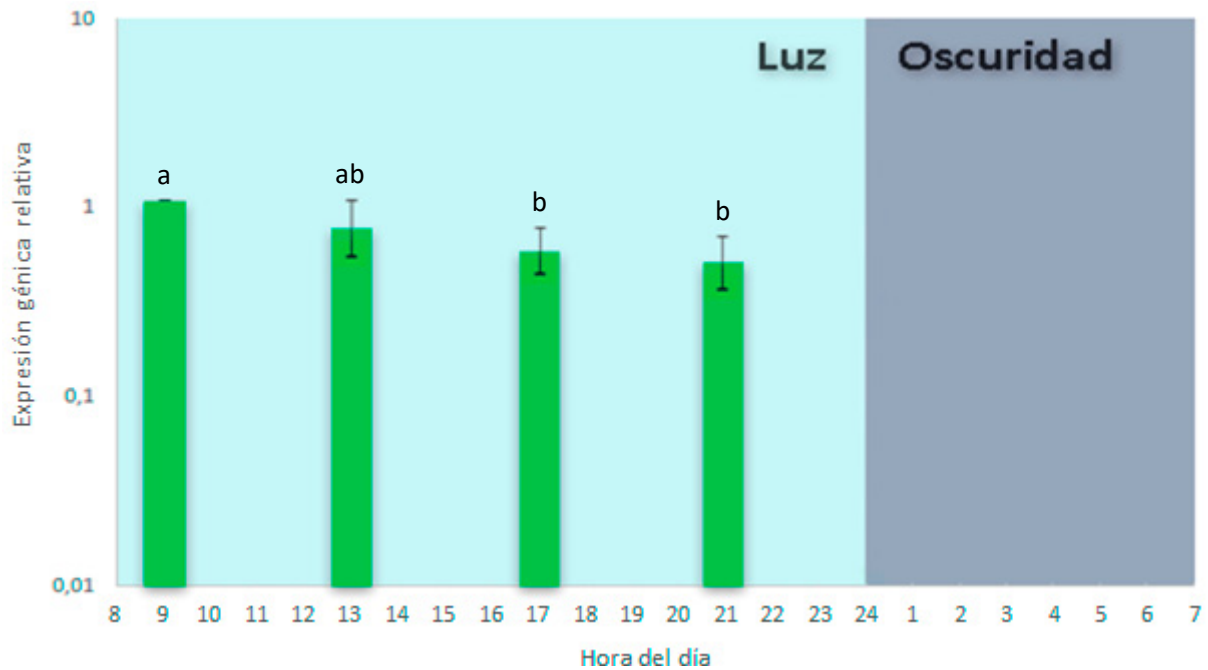


Figura 15: Efecto del ritmo circadiano sobre la expresión de CaPAL en las hojas de pimiento. Se muestra la media \pm el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos.

Efecto del ritmo circadiano sobre la expresión génica de *CaPO1* en las hojas

Se realizó una cuantificación del nivel de expresión génica del gen *CaPO1* de las hojas de pimiento a las 9h, 13h, 17h y 21h (Figura 16). Los resultados obtenidos muestran unos niveles de expresión crecientes a lo largo del día, con los mayores niveles de expresión a las 21h. Al analizar los datos de expresión génica de *CaPO1* se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos primeras horas (9h y 13h) y las 21h al compararlas entre sí (Kruskal-Wallis, $p=0,0783$), con un nivel de confianza del 90%. El test no diferencia entre las 17 h y los demás tiempos.

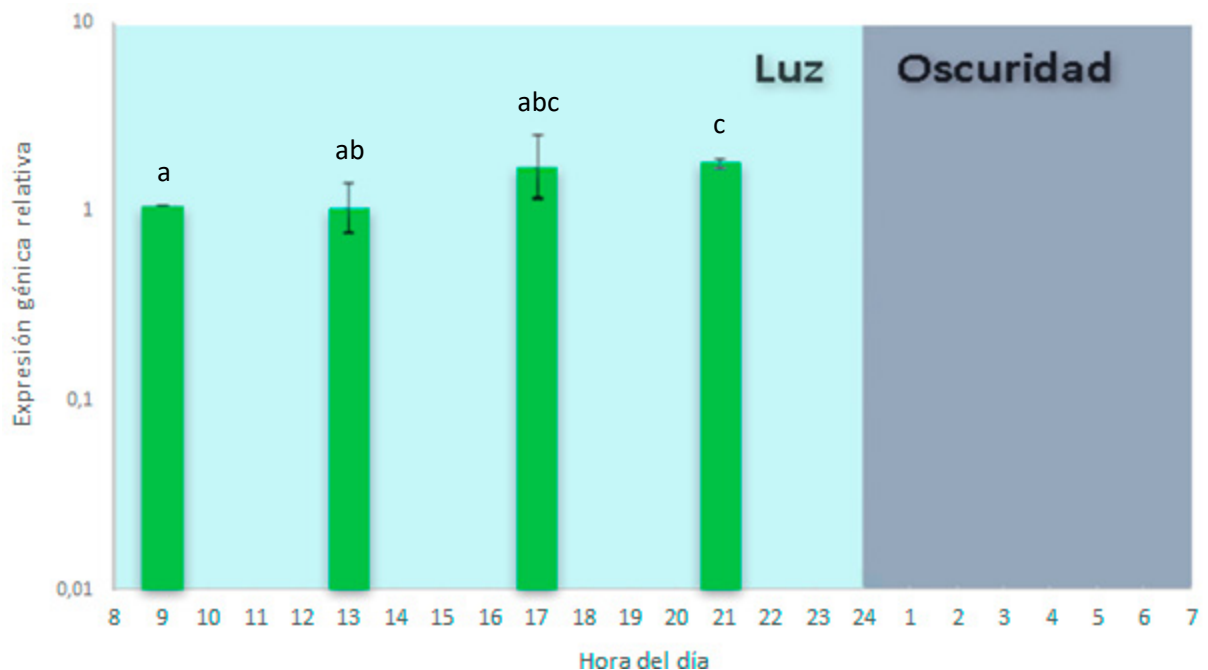


Figura 16: Efecto del ritmo circadiano sobre la expresión de CaPO1 en las hojas de pimiento. Se muestra la media \pm el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos.

5. DISCUSIÓN

La incipiente necesidad de sustituir a los perjudiciales pesticidas contra fitopatógenos ha generado un gran número de estudios que intentan encontrar nuevos agentes de biocontrol eficaces y no dañinos para la naturaleza.

Los experimentos de inducción de resistencia descritos en este trabajo muestran que PO212 no induce resistencia frente a *B. cinerea* en las plantas de *C. annuum*. Sin embargo, otros autores sí han conseguido que PO212 funcione como agente de biocontrol de otros fitopatógenos. De Cal et al., (2008) demostraron que PO212 es eficaz para controlar el oídio de las fresas producido por *Podosphaera aphanis* (que es un hongo biotrofo obligado, altamente específico de huésped (Jiménez Díaz y Montesinos, 2010)). Los cultivares de fresa tratados con *P. rubens* mostraron una disminución de la enfermedad del oídio comparada con las plantas control no tratadas. Además, la eficacia de *Penicillium* como agente de biocontrol no se ha ensayado únicamente frente a hongos, sino que también se ha probado frente a virus, como el virus del mosaico del pepino (CMV por sus siglas en inglés) en *Arabidopsis thaliana* y plantas de tabaco. Elsharkawy et al., (2012) estudiaron la eficacia de otro *Penicillium*, *P. simplicissimum*, como reductor del daño producido por CMV, y demostraron que *P. simplicissimum* actúa como PGPF y aumenta el crecimiento de las plantas tratadas, además de disminuir la gravedad de la enfermedad. Las plantas tratadas con este agente presentaban una mayor expresión de los genes de SA, JA y ET, lo que indica que genera resistencia inducida frente al CMV en *Arabidopsis* y plantas de tabaco (Elsharkawy et al., 2012).

La razón por la que nuestros resultados no muestran una inducción de resistencia por parte de *Penicillium*, y los de otros autores sí, no está clara. Aunque podría deberse a que en estos estudios el patógeno elegido no era un necrotrofo como en nuestro caso.

Por otro lado, también se han realizado estudios que describen agentes de biocontrol que sí son capaces de actuar contra la infección de *B. cinerea*. Por ejemplo, *Trichoderma harzianum* coloniza las raíces de las plantas y actúa como un PGPF (Vos et al., 2015). Cuando la planta reconoce al agente inductor responde produciendo fitoalexinas, otros compuestos antimicrobianos y activando la ISR (De Meyer et al., 1998), lo que ofrece protección frente a *B. cinerea*. Además, la utilización de especies del género *Trichoderma* como agentes de biocontrol tiene efecto sobre la generación de especies reactivas de oxígeno, limitando el ataque del patógeno. Según, Janisiewicz y Korsten, (2002) el mejor lugar para encontrar agentes de biocontrol son los entornos naturales donde crecen y compiten con los fitopatógenos. Por ello Raspor et al., (2010) decidieron utilizar levaduras aisladas de ecosistemas de vid para inhibir el crecimiento de *B. cinerea*. Rociaron uvas con las levaduras y luego con el patógeno. Con este

experimento consiguieron inhibir la infección de *Botrytis* y además descubrieron que la eficacia de las levaduras era mayor cuanto más se parecía su medio de cultivo al de las uvas (rico en glucosa). En un estudio comparativo donde se observó el efecto de varios agentes fúngicos de biocontrol sobre *Botrytis cinerea*, se encontró que el más efectivo fue una cepa de *Penicillium* (Sreevidya et al. 2015). En este trabajo otras cepas de *Penicillium* resultaron ser poco o nada efectivas, y se encontró que la producción de un metabolito secundario, la citrinina, se correlacionó con la resistencia. Aunque la cepa de *Penicillium* que fue efectiva mostró además producción de sideróforos, ácido hidroxicinámico, ácido indolacético, lipasas, proteasas y glucanasas. Este trabajo indica la especialización de determinadas cepas, lo que las hace especialmente eficaces frente a determinados patógenos. Si bien *Penicillium* PO212 es efectivo frente a *Verticillium* y *Fusarium*, ambos patógenos vasculares que siguen una estrategia de infección parecida, PO212 no es efectivo frente a *Botrytis*, que tiene una estrategia de infección diferente a aquellos.

Estos datos hacen pensar que, aunque PO212 no induzca resistencia frente a *B. cinerea* en plantas de pimiento, es muy probable que exista otro agente de biocontrol que sea eficaz en este contexto. Quizá se debería buscar otro agente que conviva con *B. cinerea* y pimiento en el ecosistema natural como apuntan Janisiewicz y Korsten, (2002), y preservarlo en un medio que simule las condiciones de crecimiento naturales. Por ello sería muy interesante seguir investigando y probando nuevos agentes de biocontrol para encontrar un agente ideal que pueda ser usado fácilmente por los agricultores y que ayude a proteger los cultivos de pimiento de este infeccioso hongo causante de tan grandes pérdidas.

La información disponible acerca de los efectos del ritmo circadiano sobre la resistencia a patógenos no es muy abundante. Existen pocos artículos que estudien las variaciones de diferentes parámetros de defensa, como la expresión génica o la actividad de ciertas enzimas a lo largo del día, tal y como se ha hecho en este trabajo.

Según nuestros resultados la cantidad de fenoles disminuye a lo largo del día y, sin embargo, la resistencia a *B. cinerea* aumenta. La cantidad de fenoles se incrementa después del ataque de un patógeno (Mikulic Petkovsek et al., 2008), por lo que a primera vista nuestros resultados no concuerdan con lo esperado. Una forma de explicar esto es que algunos fenoles son oxidados por las peroxidasas y se utilizan en los procesos de lignificación (Almagro et al., 2008; García et al., 2015). La lignina refuerza las células vegetales y las hace más resistentes frente al ataque de agentes infecciosos (Almagro et al., 2008). Por lo tanto, sería interesante medir la cantidad de lignina en las hojas de pimiento a lo largo del día. Así mismo, sería de interés medir el

peróxido de hidrógeno, puesto que para el proceso de lignificación es necesaria una oxidación a expensas de H₂O₂ de los llamados monolignoles por parte de las peroxidasas. Además, el peróxido de hidrógeno se genera en la planta ante situaciones de estrés, como la aparición de heridas (García et al., 2015) y en respuesta al ataque de patógenos (Almagro et al., 2008), y actúa como molécula de señalización en los procesos de muerte celular programada durante la respuesta hipersensible (Levine et al., 1996).

La expresión de *CaPAL* también disminuye a lo largo del día según nuestros estudios. Otros autores encontraron que la actividad PAL suele ser significativamente mayor cuando la planta se encuentra en condiciones de luz que cuando se encuentra en oscuridad (Gordon y Koukkari, 1978; Knypl et al., 1986). Además, observaron que la ritmicidad desaparece si se mantiene la planta en oscuridad, por lo que afirman que no debería considerarse como un ritmo endógeno de la planta (Knypl et al., 1986). Sin embargo, estos estudios se basan en la medida de la actividad PAL, que es el conjunto de la expresión de diferentes genes PAL en la planta. Además se trata de estudios con otras especies de plantas. La PAL participa en la biosíntesis de fenoles, y los valores de estos concuerdan con los resultados de *CaPAL* en pimiento.

Atendiendo a nuestros resultados la actividad peroxidasa también sufre una disminución a lo largo del día pero, sin embargo, la expresión génica de *CaPOI* (que es una peroxidasa) se incrementa. Para explicar estos resultados hay que tener en cuenta que en la planta hay varios tipos de peroxidasas diferentes (Almagro et al., 2008), por lo que el aumento de *CaPOI* tiene que estar siendo compensado con la disminución de la expresión de otras peroxidasas.

Para completar nuestro estudio sería interesante estudiar las plantas en horario nocturno y seguir analizando los efectos del ritmo circadiano para ver qué es lo que ocurre cuando la planta no recibe luz. Ingle et al., (2015) estudiaron la susceptibilidad de *A. thaliana* a *B. cinerea*, la planta ofreció mayor resistencia al patógeno al amanecer, aumentando su susceptibilidad con las horas de luz, luego la resistencia se incrementó de nuevo y continuó durante la noche. También sería interesante recoger muestras después de haber inoculado las plantas con el patógeno a diferentes horas para comparar los resultados con los obtenidos en este trabajo. Esto haría que los cambios en respuesta al patógeno fueran más evidentes.

Otro buen objeto de estudio para el futuro son las variaciones de las fitohormonas ácido jasmónico y ácido salicílico. Según Ingle et al., (2015) la expresión de los genes de JA en las respuestas defensivas se produce de forma más rápida al amanecer que al atardecer en *A. thaliana*. Sin embargo, aun sin presencia de patógeno, los niveles de JA comienzan a aumentar al amanecer, alcanzan un nivel máximo al medio día y a partir de ahí se reducen otra vez (Greenham y McClung, 2015). Esta estrategia responde a la necesidad de mantener un nivel de

vigilancia mayor durante el día, ya que las plantas abren los estomas para transpirar e intercambiar gases de la fotosíntesis, lo que permite a los patógenos usar esas aberturas naturales. Por tanto, el hecho de que la planta siga siendo resistente a última hora puede deberse a que los estomas ya están cerrándose (Hevia et al., 2015). Sin embargo, el haz de la hoja de pimiento, lugar donde se realizó la inoculación, no tiene estomas, por lo que el incremento de la resistencia a la infección al anochecer, observado en nuestros experimentos, no es debido al cierre de aquellos. Hevia et al. (2015) proponen que, al menos en la interacción *Arabidopsis-Botrytis*, el ritmo circadiano del patógeno es el principal responsable de la reducida infección durante el amanecer. En nuestro caso, *B. cinerea* se mantuvo en oscuridad constante hasta su inoculación en la planta, por lo que no parece que deba responder a un ritmo circadiano ajustado a las horas del día. En el futuro se sería interesante estudiar los efectos sobre la capacidad de infección que produce el ritmo circadiano en el patógeno.

Por otro lado, el SA, cuya ruta de biosíntesis es antagonica al ácido jasmónico, se acumula más rápido en la medianoche. Conforme a los experimentos de Hua, (2013), la biosíntesis de JA está regulada por el ritmo circadiano en las plantas de tabaco, y sus niveles más altos coinciden con los momentos en los que los herbívoros se alimentan; esto tiene sentido ya que el JA participa en la producción de metabolitos anti-herbívoros (Sharma y Bhatt, 2014). El SA es capaz de regular el estado redox de NPR1, reforzando el efecto del ritmo circadiano e interfiriendo en las respuestas defensivas, ya que hace que NPR1 se desplace al núcleo y active genes de defensa; por ejemplo genes que codifican proteínas PR (Zhou, 2014). El SA es un compuesto fenólico y, según nuestros resultados la cantidad de fenoles desciende durante el día, por lo que la activación de los genes de defensa por parte de NPR1 será mayor por la mañana que al atardecer. Esto puede resultar en un aumento de la resistencia a los patógenos biotrofos que atacan a la planta por la mañana (Hua, 2013), pero la resistencia frente a necrotrofos como *B. cinerea* sería menor, como observamos en nuestros resultados.

En resumen, los resultados de nuestro estudio demuestran que el agente PO212, pese a ser un agente de biocontrol eficaz de varios fitopatógenos, no induce resistencia frente a *B. cinerea* en las plantas de pimiento a pesar de haber cambiado el método de tratamiento en varias ocasiones. El ritmo circadiano al que están sometidos todos los organismos afecta a la resistencia de las plantas durante el día, así como afecta a la cantidad y/o actividad de algunos componentes celulares o enzimas. Teniendo esto en cuenta, se podría estudiar si el tratamiento con PO212 a otras horas del día muestra resultados diferentes a los obtenidos en este trabajo. Está claro que el ritmo circadiano controla múltiples elementos de la planta y, aun así, no parece

haber demasiados estudios que se centren en este tema. Por ello, todavía queda mucho trabajo que realizar para llegar a discernir la repercusión global que tiene el ritmo circadiano en las plantas, que es un tema sobre el que merece la pena intentar arrojar un poco más de luz.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son las siguientes:

- La inmersión de las raíces, el tratamiento con gotas y la pulverización de las hojas de *C. annuum* con una suspensión del agente PO212 no inducen resistencia frente a la infección por *B. cinerea*.
- El ritmo circadiano de *C. annuum* influye en su resistencia al patógeno *B. cinerea* y es diferente según la hora del día; siendo más susceptible a la infección en las primeras horas de luz, y siendo más resistente a última hora de la tarde.
- La actividad peroxidasa, la cantidad de fenoles y la expresión del gen *CaPAL* de las hojas de *C. annuum* se ve reducida por el ritmo circadiano a lo largo del día. Por el contrario, la expresión del gen *CaPOI* se ve incrementada. No hay diferencias en la actividad β -1,3-glucanasa ni quitinasa. Fenoles, PAL y peroxidasas podrían estar implicados en la variación de la resistencia observada respecto al ritmo circadiano.

CONCLUSIONS

Based on the outcome of this work the following conclusions can be drawn:

- Treatment of *C. annuum* with PO212 either by dipping the roots, by drop-inoculation or spraying of the leaves, does not induce resistance against the attack of *B. cinerea*.
- The circadian rhythm of *C. annuum* affects its resistance against *B. cinerea* and it differs throughout the day; being more susceptible to infections during the first hours of light and more resistant on late afternoon.
- The peroxidase activity, the amount of phenols and the expression of the *CaPAL* gene of *C. annuum* are decreased by the circadian rhythm throughout the day. However, the expression of *CaPOI* gene is increased. There are no significant differences in the β -1,3-glucanase or chitinase activities. Phenols, PAL and peroxidases might be involved in the variation of the resistance regarding the circadian rhythm.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Almagro, L., Gómez Ros, L., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A. y Pedreño, M.** (2008). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 377-390.
- Bieniawska, Z., Espinoza, C., Schlereth, A., Sulpice, R., Hinch, D. y Hannah, M.** (2008). Disruption of the *Arabidopsis* circadian clock is responsible for extensive variation in the cold-responsive transcriptome. *Plant Physiology*, **147**, 263-279.
- Chester, K.** (1933). The problem of acquired physiological immunity in plants. *The Quarterly Review of Biology*, **8**, 129-154.
- Chisholm, S., Coaker, G., Day, B. y Staskawicz, B.** (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**, 803-814.
- Covington, M., Maloof, J., Straume, M., Kay, S. y Harmer, S.** (2008). Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth y development. *Genome Biology*, **9**, R130.
- De, A.** (2003). *Capsicum*. 1st ed. London: Taylor & Francis.
- De Cal, A., Garcia-Lepe, R. y Melgarejo, P.** (2000). Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: histological studies of infected and induced Tomato Stems. *Phytopathology*, **90**, 260-268.
- De Cal, A., Redondo, C., Szejnberg, A. y Melgarejo, P.** (2008). Biocontrol of powdery mildew by *Penicillium oxalicum* in open-field nurseries of strawberries. *Biological Control*, **47**, 103-107.
- De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. y Höfte, M.** (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, **104**, 279-286.
- Dean, R., van Kan, J., Pretorius, Z., Hammond-Kosack, K., Di Pietro, A., Spanu, P., Rudd, J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. y Foster, G.** (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, **13**, 414-430.
- Diaz, J., Silvar, C., Varela, M., Bernal, A. y Merino, F.** (2005). *Fusarium* confers protection against several mycelial pathogens of pepper plants. *Plant Pathology*, **54**, 773-780.
- Dickinson, M.** (2003). *Molecular plant pathology*. 1st ed. London: BIOS Scientific Publishers.
- Durrant, W. y Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **42**, 185-209.
- Elad, Y.** (2007). *Botrytis*. 1st ed. Dordrecht: Springer.
- Elad, Y., Vivier, M. y Fillinger, S.** (2015). Botrytis, the good, the bad and the ugly. In: *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Switzerland.
- Elsharkawy, M., Shimizu, M., Takahashi, H. y Hyakumachi, M.** (2012). Induction of systemic resistance against cucumber mosaic virus by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Pathology*, **61**, 964-976.
- Estrada Arias, B., Bernal Pita da Veiga, M. y Merino de Cáceres, F.** (2000). *Maduración del pimiento de Padrón*. 1st ed. [Coruña]: Universidade da Coruña, Servicio de Publicacións.
- Fao.org.** (2014). FAOSTAT. [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> [Consultado el 11 Jul. 2017].
- García, T.** (2015). *Caracterización de las propiedades del vanillilnonanoato para la protección vegetal*. Tesis de Licenciatura, Universidade da Coruña.

- García, T., Gutiérrez, J., Veloso, J., Gago-Fuentes, R. y Díaz, J.** (2015). Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. *Journal of Plant Physiology*, **176**, 202-209.
- Gordon, W. y Koukkari, W.** (1978). Circadian rhythmicity in the activities of phenylalanine ammonia-lyase from *Lemna perpusilla* and *Spirodela polyrhiza*. *Plant Physiology*, **62**, 612-615.
- Greenham, K. y C. R. McClung** (2015). Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nat Rev Genet*, **16**, 598-610.
- Hammond-Kosack y Jones** (2015). Responses to Plant Pathogens. In: B. Buchanan, ed., *Biochemistry & molecular biology of plants*, 2nd ed. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons Inc.
- Hanley, M., Lamont, B., Fairbanks, M. y Rafferty, C.** (2007). Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **8**, 157-178.
- Hevia, M.A., Canessa, P., Müller-Esparza, H. y Larrondo L.F.** (2015). A circadian oscillator in the fungus *Botrytis cinerea* regulates virulence when infecting *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, **112**, 8744-8749.
- Hoagland, D.R. y Arnon, D.I.** (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, Calif.: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station.
- Hua, J.** (2013). Modulation of plant immunity by light, circadian rhythm, y temperature. *Current Opinion in Plant Biology*, **16**, 406-413.
- Imperato, F.** (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: *Phytochemistry*. Kerala, India.
- Ingle, R., Carstens, M. y Denby, K.** (2006). PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *BioEssays*, **28**, 880-889.
- Ingle, R., Stoker, C., Stone, W., Adams, N., Smith, R., Grant, M., Carré, I., Roden, L. y Denby, K.** (2015). Jasmonate signalling drives time-of-day differences in susceptibility of *Arabidopsis* to the fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *The Plant Journal*, **84**, 937-948.
- Janisiewicz, W. y Korsten, L.** (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 411-441.
- Jiménez Díaz, R. M. y Montesinos, E.** (2010). *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos*. 1ª ed. Valencia: Sociedad Española de Fitopatología.
- Jones, J. y Dangl, J.** (2006). The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Karasov, T., Chae, E., Herman, J. y Bergelson, J.** (2017). Mechanisms to mitigate the trade-off between growth and defense. *The Plant Cell*, **29**, 666-680.
- Knypl, J., Janas, K. y Wolska, M.** (1986). Rhythmicity of L-phenylalanine ammonia-lyase activity in *Spirodela oligorrhiza*. Effects of darkening, abscisic acid and 1-amino-2-phenylethylphosphonic acid. *Physiologia Plantarum*, **66**, 543-549.
- Kuč, J.** (1982). Induced Immunity to Plant Disease. *BioScience*, **32**, 854-860.
- Larena, I., Melgarejo, P. y De Cal, A.** (2003). Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, **151**, 600-606.
- Larena, I., Sabuquillo, P., Melgarejo, P. y De Cal, A.** (2003). Biocontrol of *Fusarium* and *Verticillium* wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions. *Journal of Phytopathology*, **151**, 507-512.
- Levine, A., Pennell, R., Alvarez, M., Palmer, R. y Lamb, C.** (1996). Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology*, **6**, 427-437.

- Lucas, J.** (2002). Plant pathology and plant pathogens. 1st ed. Malden, Mass. [s.a.]: Blackwell Publ.
- McClung, C.** (2001). Circadian rhythms in plants. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, **52**, 139-162.
- Mikulic Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F. y Veberic, R.** (2008). Increased phenolic content in apple leaves infected with the apple scab pathogen. *Journal of Plant Pathology*, **90**, 49-55.
- Muntaloña, M.** (1999). Guía de los hongos microscópicos. 1st ed. Barcelona, España: Ediciones Omega.
- Murali, M., Sudisha, J., Amruthesh, K., Ito, S. y Shetty, H.** (2012). Rhizosphere fungus *Penicillium chrysogenum* promotes growth and induces defence-related genes and downy mildew disease resistance in pearl millet. *Plant Biology*, **15**, 111-118.
- Nuez Viñals, F., Gil Ortega, R. y Costa García, J.** (1996). El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Madrid: Mundi-Prensa.
- Pfaffl, M.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**, 45-45.
- Raspor, P., Miklic-Milek, D., Avbelj, M. y Cadez, N.** (2010). Biocontrol of *B. cinerea* with wine yeasts. *Food Technol. Biotechnol.*, **48**, 336-343.
- Roden, L. e Ingle, R.** (2009). Lights, rhythms, infection: the role of light and the circadian clock in determining the outcome of plant-pathogen interactions. *The Plant Cell Online*, **21**, 2546-2552.
- Sharma, M. y Bhatt, D.** (2014). The circadian clock and defence signalling in plants. *Molecular Plant Pathology*, **16**, 210-218.
- Silvar, C., Merino, F. y Díaz, J.** (2008). Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, **165**, 1120-1124.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144-158.
- Sreevidya, M., Gopalakrishnan, S., Melo, T.M., Simic, N., Bruheim, P., Sharma, M., Srinivas, V. y Alekhya, G.** (2015). Biological control of *Botrytis cinerea* and plant growth promotion potential by *Penicillium citrinum* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Biocontrol Science and Technology*, **25**, 739-755.
- Unión Europea. 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo**, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 24 de noviembre de 2009, núm. **309**, 71-86.
- van Kan, J.** (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, **11**, 247-253.
- van Kan, J., Shaw, M. y Grant-Downton, R.** (2014). Botrytis species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue?. *Molecular Plant Pathology*, **15**, 957-961.
- van Loon, L.** (1985). Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, **4**, 111-116.
- van Loon, L.** (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, **119**, 243-254.
- Vázquez, G.** (2013). Mejora de la eficiencia de *Penicillium oxalicum* como agente de biocontrol en enfermedades de plantas horticolas. Ingeniero Agrónomo. Universidad Politécnica de Madrid.

Vázquez, G., Melgarejo, P., De Cal, A. y Larena, I. (2013). Persistence, survival, vertical dispersion, and horizontal spread of the biocontrol agent, *Penicillium oxalicum* strain 212, in different soil types. *Applied Soil Ecology*, **67**, 27-36.

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

Villarino, M., De Cal, A., Melgarejo, P., Larena, I. y Espeso, E. (2015). The development of genetic and molecular markers to register and commercialize *Penicillium rubens* (formerly *Penicillium oxalicum*) strain 212 as a biocontrol agent. *Microbial Biotechnology*, **9**, 89-99.

Vos, C., De Cremer, K., Cammue, B. y De Coninck, B. (2015). The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Molecular Plant Pathology*, **16**, 400-412.

Walters, D., Newton, A. y Lyon, G. (2007). *Induced resistance for plant defence*. 1st ed. Oxford: Wiley.

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

Wang, W., Barnaby, J., Tada, Y., Li, H., Tör, M., Caldelari, D., Lee, D., Fu, X. y Dong, X. (2011). Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature*, **470**, 110-114.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. y van Kan, J. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, **8**, 561-580.

Yakir, E., Hilman, D., Harir, Y. y Green, R. (2006). Regulation of output from the plant circadian clock. *FEBS Journal*, **274**, 335-345.

Zhou, M. (2014) *The molecular interplay between the circadian clock and the plant immune signal, salicylic acid*. PhD Thesis, Duke University.

Imágenes

- **Angel, M.** (s.a.). Conidia de *Botrytis cinerea* sobre tejido vegetal. [imagen].
- **Biowikitec.wikidot.com.** (2014). Líneas de investigación de la biotecnología vegetal hasta 2014 - BIOWIKITEC. [En línea] Disponible en: <https://goo.gl/FKgA9z> [Consultado el 12 Jul. 2017].
- **draculina_ak** (2008). Pimientos de Padrón. [imagen] Disponible en: <https://goo.gl/bqNrZj> [Consultado el 10 Jul. 2017].
- **Es.wikipedia.org.** (2017). Ruta del ácido shikímico. [En línea] Disponible en: <https://goo.gl/aV1MbP> [Consultado el 12 Jul. 2017].
- **Fao.org.** (2014). FAOSTAT. [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> [Consultado el 11 Jul. 2017].
- **Hamburguesa Nostra** (2010). [imagen] Disponible en: <https://goo.gl/c2L7Xi> [Consultado el 10 Jul. 2017].
- **Lastras, J.** (2009). Pimientos del Piquillo Asado. [imagen] Disponible en: <https://goo.gl/Lg4T5S> [Consultado el 10 Jul. 2017].
- **M a n u e l** (2013). del Jardín Botánico de Madrid en noviembre de 2013-342. [imagen] Disponible en: <https://goo.gl/rbLbzx> [Consultado el 10 Jul. 2017].
- **Paul Bachi**, University of Kentucky Research and Education Center, Bugwood.org
- **Poore, S.** (2006). Pepper Seeds. [imagen] Disponible en: <https://goo.gl/MHrwS4> [Consultado el 10 Jul. 2017].
- **Rodríguez, E.** (2009). Chile Pimiento. [imagen] Disponible en: <https://goo.gl/iJ8rtG> [Consultado el 10 Jul. 2017].
- **State, P.** (2009). capsicum. [imagen] Disponible en: <https://goo.gl/mcSo1u> [Consultado el 10 Jul. 2017].
- Fotografía de la portada: **Suzie's Farm** (2012). 2014 Hot Peppers: Padron. [imagen] Disponible en: <https://goo.gl/1qYyB2> [Consultado el 18 Jul. 2017].