

UNIVERSITAT JAUME I

Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals



**UNIVERSITAT
JAUME·I**

**ENGINYERIA AGROALIMENTÀRIA
I DEL MEDI RURAL**

Resistencia inducida en *Arabidopsis thaliana* frente a *Hyaloperonospora arabidopsidis* y en *Cucurbita pepo* frente a *Podosphaera xanthii*

Estudiant/a: Elena Hinojal Vicente.

Tutor/a: Víctor Flors Herrero

Convocatòria: Julio 2021

Índice General

1. Introducción	10
1.1. Cultivo del calabacín (Cucurbita pepo)	10
1.2. El oidio - Powdery mildew (Podosphaera xanthii)	13
1.3. Arabidopsis thaliana	14
1.4. Hyaloperonospora arabidopsidis	15
1.5. Interacciones planta patógeno	17
1.5. Mecanismos de defensa de las plantas	18
1.5.1. Sistemas de defensa constitutivos	19
1.5.2. Sistemas de defensa inducibles	21
1.5.3. Priming	23
1.7. Respuestas hormonales	25
2. Metodología	38
2.1. Tratamientos utilizados	38
BABA	38
eDNA	40
I3CA	42
2.2. Diseño del experimento	43
Experimento 1- Arabidopsis thaliana	43
Experimento 2- Calabacín 1	44
Experimento 3- Calabacín 2	45
Experimento 4- Calabacín extracción de hormonas	46
2.3. Fenotipos de resistencia	47
2.3.1. Conteo de esporas	47
2.3.2. Tinción	49
2.4. Análisis hormonal	51
3. Objetivos del trabajo	54
4. Resultados	56
4.1. Experimento 1- Arabidopsis thaliana	56
Conteo de esporas	56
Tinción	57
4.2. Experimento 2- Calabacín 1	59
Conteo de esporas	59
Tinción	60
4.3. Experimento 3- Calabacín 2	61
Conteo de esporas	61

Tinción	62
4.4. Experimento 4- Calabacín extracción de hormonas	64
4.4.1. ABA	64
4.4.2. SA	65
4.4.3. JA	67
4.4.4. I3CA	69
4.4.5. IAA	70
4.4.6. OPDA	71
4.3.7. Kinetina	73
4.3.8. Benzylaminopurine	75
6. Discusión	78
7. Conclusiones	86
8. Bibliografía	89

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Resultados del conteo de esporas en <i>A.thaliana</i>	56
Gráfica 2. Resultados de la tinción en <i>A.thaliana</i>	57
Gráfica 3. Conteo de esporas Experimento 2- Calabacín 1	58
Gráfica 4. Tinción Experimento 2- Calabacín 1	59
Gráfica 5. Conteo de esporas Experimento 3- Calabacín 2	61
Gráfica 6. Tinción Experimento 3- Calabacín 2	62
Gráfica 7. Contenido hormonal en ABA	64
Gráfica 8. Contenido hormonal en SA	66
Gráfica 9. Contenido hormonal en JA	68
Gráfica 10. Contenido hormonal en I3CA	69
Gráfica 11. Contenido hormonal en IAA	70
Gráfica 12. Contenido hormonal en OPDA	72
Gráfica 13. Contenido hormonal en Kinetina	73
Gráfica 14. Contenido hormonal en Bencilaminopurina	75

Índice de Figuras

Figura 1. Morfología calabacín	10
Figura 2. Calabacín Black Beauty	11
Figura 3. Morfología <i>P. xanthii</i>	12
Figura 4. Sintomatología <i>P.xanthii</i> en calabacín	13
Figura 5. Ciclo <i>Arabidopsis thaliana</i> .	14
Figura 6. Estructura de infección HPA	15
Figura 7. Colonización de la hoja	15
Figura 8. Estructura conidiosporas	15
Figura 9. Esporulación HPA	16
Figura 10. Diagrama acción genes PEN	16
Figura 11. Diagrama resistencia basal	17
Figura 12. Representación gráfica del modelo de defensa de las plantas “zig zag”	18
Figura 13. Bomba mostaza.	19
Figura 14. Refuerzo de la pared celular mediante la acumulación de callosa	20
Figura 15. Acumulación de peróxido de hidrógeno	21
Figura 16. Estructuras moleculares fitoalexinas.	22
Figura 17. Estructura ABA	24
Figura 18. Ruta síntesis ABA	25
Figura 19. Estructura SA	26
Figura 20. Ruta de síntesis SA	27
Figura 21. Estructura JA	27
Figura 22. Ruta de síntesis de JA	28
Figura 23. Estructura IAA	29
Figura 24. Ruta síntesis IAA	30
Figura 25. Estructura I3CA	31
Figura 26. Estructura OPDA	32
Figura 27. Ruta síntesis y transformación del OPDA	32

Figura 28. Estructura Kinetina	32
Figura 29. Estructura 6 Benzylaminopurina	32
Figura 30. Ruta síntesis citoquininas	33
Figura 31. Resumen de la interacción hormonal en la defensa vegetal	35
Figura 32. Estructura BABA	37
Figura 33. Representación eDNA	39
Figura 34. Resultados del NanoDrop	40
Figura 35. Estructura I3CA	41
Figura 36. Modelo de priming callosa	41
Figura 37. Esquema experimento 1	43
Figura 38. Esquema experimento 2	44
Figura 39. Esquema experimento 3	45
Figura 40. Esquema experimento 4	46
Figura 41. Gradilla cámara cuentaglóbulos	47
Figura 42. Rotulación de los tubos de 2ml	50
Figura 43. Colocación viales cromatógrafo,	51
Figura 44. Imágenes tinciones Experimento 1- Arabidopsis thaliana	57
Figura 45. Imágenes tinciones Experimento 2- Calabacín 1	61
Figura 46. Imágenes tinciones Experimento 3- Calabacín 2	63

Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía Cucurbita pepo	9
Tabla 2. Producción mundial de calabaza y calabacín.	10
Tabla 3. Tabla producción calabacín 2003	11
Tabla 4. Taxonomía Arabidopsis thaliana	13
Tabla 5. Tabla resumen sistemas de defensa constitutivos	20
Tabla 6. Proteínas PR y sus funciones	21
Tabla 7. Tabla resumen sistemas de defensa inducibles	22
Tabla 8. Tabla de ejemplos de resistencia inducida por BABA	38
Tabla 9. Concentraciones y dosis de los tratamientos A.thaliana	42
Tabla 10. Concentraciones y dosis de los tratamientos Calabacín	42
Tabla 11. Valores guía para la valoración de la tinción A.thaliana	49
Tabla 12. Valores guía para la valoración de la tinción Calabacín	49
Tabla 13. Tabla resultados t-test conteo esporas Experimento 1- Arabidopsis thaliana	56
Tabla 14. Tabla resultados t-test tinción Experimento 1- Arabidopsis thaliana	57
Tabla 15. Tabla resultados t-test conteo esporas Experimento 2- Calabacín 1	58
Tabla 16. Tabla resultados t-test conteo esporas Experimento 2- Calabacín 1	59
Tabla 17. Tabla resultados t-test conteo esporas Experimento 3- Calabacín 2	61
Tabla 18. Tabla resultados t-test tinción Experimento 3- Calabacín 2	62
Tabla 19. Tabla resultados t-test ABA	64
Tabla 20. Tabla resultados t-test SA	65
Tabla 21. Tabla resultados t-test JA	67
Tabla 22. Tabla resultados t-test I3CA	68
Tabla 23. Tabla resultados t-test IAA	70
Tabla 24. Tabla resultados t-test OPDA	71
Tabla 25. Tabla resultados t-test Kinetina	73
Tabla 26. Tabla resultados t-test Bencilaminopurina	74

Abreviaturas y símbolos

BABA	Ácido β -aminobutírico	ABA	Ácido abscísico
eDNA	DNA extracelular	SA	Ácido salicílico
I3CA	Ácido indol-3-carboxílico	JA	Ácido jasmónico
CT	Control	IAA	Ácido indolacético
BB	Variedad Black Beauty	OPDA	Ácido 12-oxofitodienoico
MQ	Agua miliQ	ROS	Especies reactivas de oxígeno
eDNA	extracelular DNA	rpm	Revoluciones por minuto
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos	<i>P. xanthii</i>	<i>Podospaera xanthii</i>
ETI	Effector Triggered Immunity	SI	Estándar Interno
PTI	Pattern-triggered immunity	HPA	Hyaloperonospora arabidopsidis
ET	Etileno	SAR	Resistencia sistémica adquirida
PR	Proteínas relacionadas con la patogenicidad		

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Cultivo del calabacín (*Cucurbita pepo*)

El calabacín pertenece a la familia *Cucurbitaceae*, a la especie *Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* destinada a la alimentación y a la variedad *condensa destinada a ornamental*. El calabacín es originario de América, aunque algunas fuentes le dan un posible origen asiático. Su llegada a Europa data de principios del siglo XVI (4). Se trata de una planta anual, su crecimiento es indeterminado y en forma rastrera. Consta de un sistema radicular pivotante y los tallos al entrar en contacto con la tierra húmeda pueden generar raíces adventicias.

Reino	División	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
Plantae	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Cucurbitales	Cucurbitaceae	<i>Cucurbita</i>	<i>Cucurbita pepo</i>

Tabla 1. Taxonomía *Cucurbita pepo*.

Morfológicamente tiene las siguientes características:

La hoja (**Figura 1. A**) es palmeada con 5 lóbulos y el margen es dentado, el haz es glabro y el envés está cubierto de pelos a lo largo de las nervaduras, su color oscila entre el verde claro y el oscuro, dependiendo de la variedad.

El fruto (**Figura 1. B**) tiene forma pepinoide, es carnoso y unilocular y el color depende de la variedad. Este se recolecta aproximadamente cuando se encuentra a mitad de su desarrollo ya que el fruto maduro contiene numerosas semillas y no es comercializable debido a la dureza del epicarpio y a su gran volumen. Las semillas son de color blanco-amarillento, ovales, alargadas, puntiagudas, lisas, con un surco longitudinal paralelo al borde exterior, longitud de 1,5 centímetros, anchura de 0,6-0,7 centímetros y grosor de 0,1-0,2 centímetros.

El tallo principal (**Figura 1. C**) es cilíndrico y grueso, este puede alcanzar 1 metro y está recubierto de pelos, los entrenudos son cortos y de ellos parten las hojas, flores, frutos y numerosos zarcillos.

Las flores (**Figura 1. D**) son monoicas y son vistosas, situadas axilarmente, grandes y acampanadas de color amarillo contituidas por 5 pétalos, las flores femeninas son de menor tamaño que las masculinas, el ovario de estas es ínfero, tricarpelar, trilocular y

alargado, per lo que los tres estilos estan soldados en su base y son libres en la insercion con el estigma, las flores masculinas poseen tres estambres soldados.

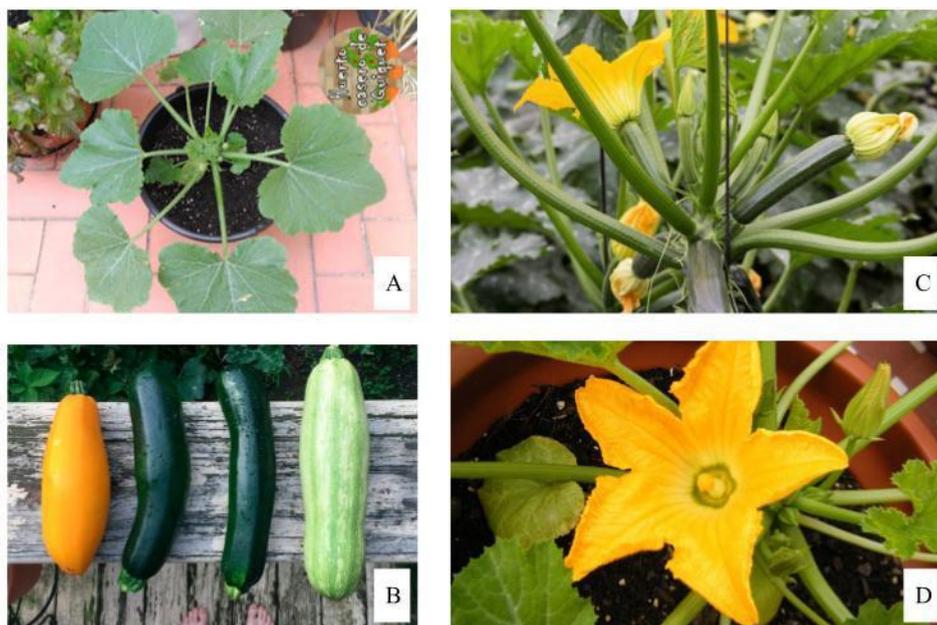


Figura 1. Hojas de calabacín (A), Fruto (B), Tallo calabacín (C), Flor calabacín (D)

La producción de calabacín a nivel mundial es difícil obtener datos de superficie y producción de calabacín por países productores, ya que la mayor parte de ellos incluyen en las estadísticas oficiales calabazas y calabacines conjuntamente, pero para hacernos a la idea de la importancia de este se muestra la en **Tabla 2.** la producción de calabacín y calabaza a nivel mundial.

Calabazas, todas clases	Superficie (ha)	Producción (Tm)
Ucrania	50.000	1.100.000
Estados Unidos de América	39.540	804.260
Egipto	39.200	710.000
México	39.000	560.000
República Islámica de Irán	40.000	505.000
Italia	16.834	494.087
Cuba	69.000	480.000
Turquia	22.000	368.000
Sudáfrica	18.000	366.643
España	7.000	300.000
TOTAL	1.004.079	14.862.190
TOTAL MUNDO	1496889	19697111

Tabla 2. Producción mundial de calabaza y calabacín.
Fuente FAOSTAT (Datos provisionales 2004 (4))

La producción de calabacín se distribuye en España por comunidades autónomas como se muestra en la **Tabla 3**. concentrándose la mayor parte de esta producción en Andalucía y en concreto la mayor parte de esta producción se realiza en protegido:

Comunidad Autónoma	Superficie (ha)				Rendimiento (kg/ha)			Producción (Tm)
	Secano	Regadío		Total	Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
AND	39	441	4159	4639	7910	45279	56217	254084
CAN	0	233	107	340	-	29112	48547	11978
CAT	36	121	52	209	10124	32170	62264	7495
C. VAL	7	195	41	243	-	24205	47073	6650
EXT	-	200	-	200	-	32125	-	6425
ARA	-	42	-	42	-	60000	-	2520
Total	82	1232	4359	5673	18034	222891	214101	289152
Total España	139	1710	4366	6215	9324	32601	56030	301700

Tabla 3. Tabla producción calabacín 2003 (Fuente: Mapa. Anuario estadístico Agroalimentario 2003) (4)

Como ya se ha comentado anteriormente hay una gran cantidad de variedades de calabacín, en este caso vamos a utilizar el material vegetal Calabacín Black Beauty cuyas características son que la mata carece de ramificaciones, es muy precoz, sus frutos son finos, alargados y de un color verde oscuro pudiendo tener motas blancas, el principal interés de esta variedad es su alta productividad ya que mientras se le vayan quitando los calabacines no deja de fructificar.



Figura 2. Calabacín Black Beauty

1.2. El oidio - Powdery mildew (*Podosphaera xanthii*)

El oidio es una de las enfermedades más graves y más comunes de las cucurbitáceas, esta enfermedad provoca una reducción del crecimiento y deseca prematuramente las hojas reduciendo la calidad y comerciabilidad de los frutos. Esta enfermedad es causada generalmente por dos especies de hongos, *Podosphaera xanthii* (Castagne) y *Golovinomyces cichoracearum* var. *cichoracearum* (DC), hay que destacar que estos hongos tienen una distribución geográfica distinta, mientras *P. xanthii* predomina en áreas tropicales y templadas, *G. cichoracearum* var. *cichoracearum* parece prevalecer en Europa continental. Teniendo en cuenta la situación geográfica, España está en una zona templada, en el sur de España se ha identificado *P. xanthii* como la única causa del mildiu polvoroso (1), por lo cual nos centraremos en este patógeno.

P. Xanthii es un patógeno biotrófico obligado, por lo cual requiere que las células de su hospedador estén vivas. La infección consiste en una estructura especializada responsable de la absorción de nutrientes y la secreción de efectores en la planta llamada haustorio, es un patógeno altamente móvil que es capaz de dispersarse fácilmente por el viento y las corrientes de aire. Aunque generalmente se desconoce la fuente inicial de inóculo (3).

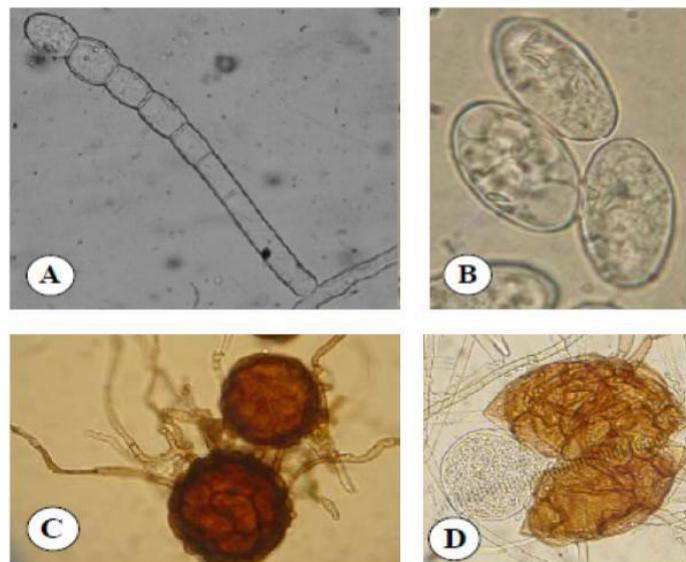


Figura 3. A. Conidios inmaduros de *Podosphaera xanthii*. B. Conidios ovoides con cuerpos de fibrosina. C. Cleistotecios con apéndices miceliales septados. D. Asca hialina inmadura en un cleistotecio parcialmente abierto. (2)

La sintomatología en la planta consiste en la aparición de una masa blanca con aspecto polvoriento que suele aparecer en las hojas, los pecíolos y en las yemas jóvenes de las

cucurbitáceas (**Figura 4. B**) cuando las condiciones medioambientales son favorables, la masa puede llegar a cubrir toda la superficie de la hoja incluso puede llegar a cubrir el envés de la hoja, además de producir una caída prematura de las hojas (**Figura 4. A**). La infección al alcanzar los tejidos más profundos las hojas toman una coloración amarilla, luego marrón y finalmente secándose (**Figura 4. C**) (3).

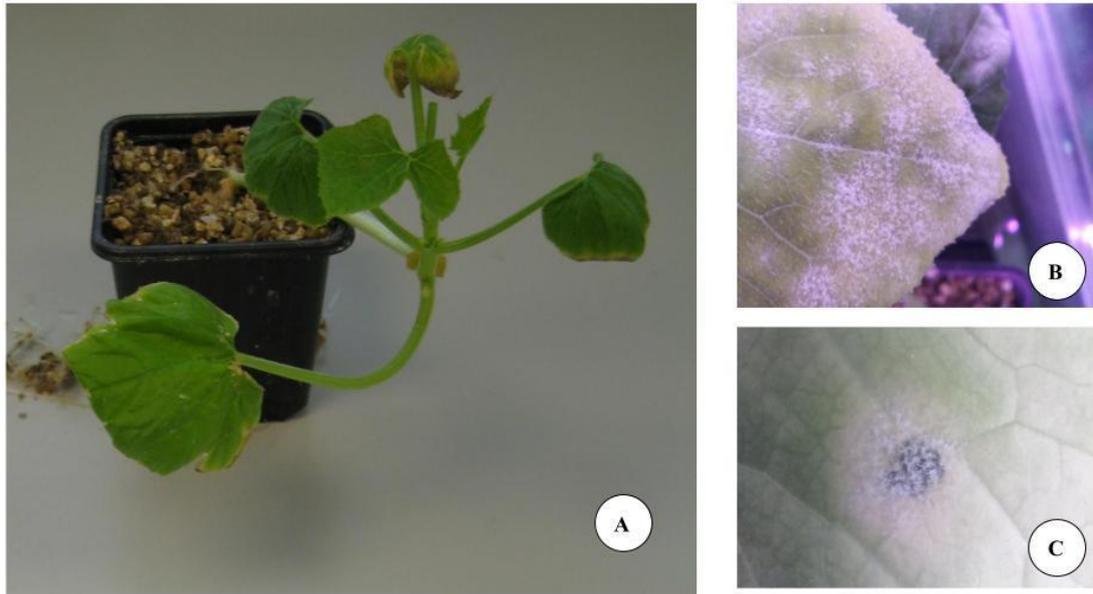


Figura 4. Sintomatología *P.xanthii* en calabacín.

Otra de las motivaciones a la hora de realizar este estudio es que se han detectado cepas de este resistentes a hasta 4 fungicidas, por lo que hay que considerar si las recomendaciones actuales para el manejo del oídio son las más indicadas dado que es este patógeno es bastante capaz de adaptar su metabolismo para sobrevivir (4).

1.3. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una planta de un tamaño muy reducido, de la familia Brassicaceae. Es uno de los organismos modelo para el estudio de las ciencias vegetales, esto viene por su reducido tamaño, su veloz ciclo de vida, el cual oscila sobre las 6 semanas, además su genoma es bastante corto, 157 Mbp, esto permitió que fuera la primera planta de la que se consiguió secuenciar su genoma entero. Todos estos motivos dotan a *A.thaliana* de un gran interés en los estudios vegetales (18).

Reino	División	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
Plantae	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Brassicales	Brassicaceae	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Tabla 4. Taxonomía *Arabidopsis thaliana*.

Morfológicamente tiene las siguientes características:

Es una planta herbácea de pequeño tamaño (10-30 cm) con hojas en la base del tallo formando una roseta a su alrededor y alguna pequeña hoja aislada a lo largo de la planta. Sus flores presentan 4 pétalos en forma de cruz (de ahí su pertenencia a las crucíferas) y se acumulan en racimos al final de los tallos, terminando por formar silicuas tabicadas repletas de pequeñas semillas (0,5 mm de diámetro) ovoideas (18).

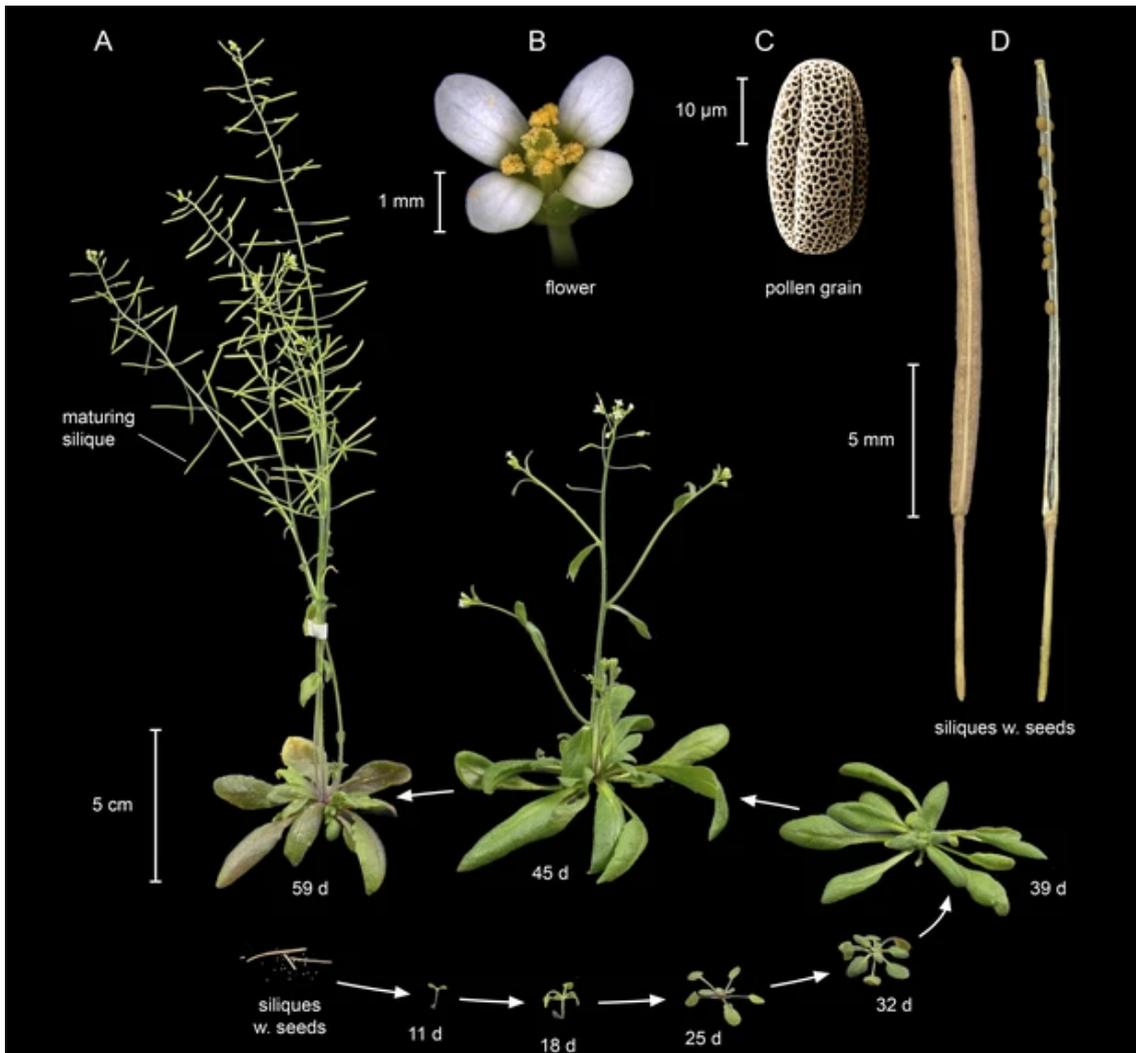


Figura 5. Ciclo *Arabidopsis thaliana*. Créditos de imagen: B y C, Maria Bernal y Peter Huijser; otros fotógrafos, Ines Kubigsteltig y Klaus Hagemann (18).

1.4. *Hyaloperonospora arabidopsidis*

La infección por mildiú veloso de *A.thaliana* es causada por *Hyaloperonospora arabidopsidis* el cual es un oomiceto biotrófico obligado, este patógeno ha pasado por varios cambios de nombres anteriormente se llamaba *Hyaloperonospora parasitica* y antes *Peronospora parasitica*. Las estructuras de infección son los apresorios, las hifas de infección y los haustorios los cuales se muestran en la **Figura 6**.

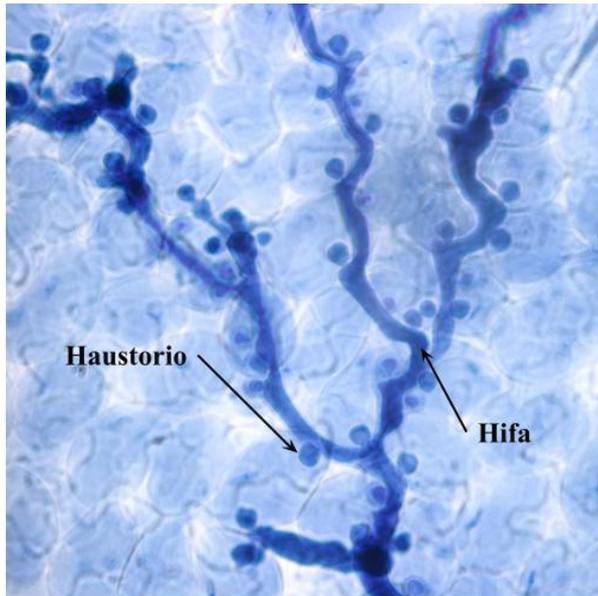


Figura 6. Estructura de infección HPA.

EL ciclo de infección de HPA comienza con la llegada de las conidiosporas a la superficie de la hoja, estas germinan produciendo el apresorio (generalmente sobre la unión de dos células epidérmicas), de este se genera el tubo germinal y después se produce una hifa de penetración. Los haustorios se introducen en las células y captan nutrientes para poder ramificar las hifas en el espacio intercelular, de las cuales surgen más haustorios, estos haustorios suelen ser de forma piriforme esto se muestra en la **Figura 7**. Las puntas de las hifas ubicadas en las cavidades subestomáticas se convierten en primordiales conidióforos, luego emergen a través de los estomas donde se expanden en estructuras en forma de árbol que transportan las conidiosporas **Figura 8**. Cuando las estructuras en forma de árbol emergen al exterior la planta de *A.thaliana* se ve como en la **Figura 9**. (10)

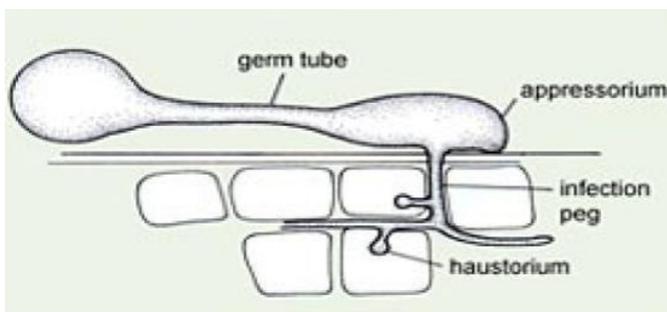


Figura 7. Colonización de la hoja.



Figura 8. Estructura conidiosporas



Figura 9. Esporulaci3n HPA

1.5. Interacciones planta pat3geno

- *Non-host*, como su nombre indica es aquella en la que la planta no es hu3sped para el pat3geno, o bien por que el pat3geno no es capaz de colonizar las c3lulas (tipo 1) o por que la planta activa una respuesta muy r3pida, eficiente y poco costosa energ3ticamente hablando (tipo 2). Esta se activa mediante los PAMPs, por lo que no es una respuesta espec3fica. Un ejemplo son los genes PEN1 PEN2 y PEN3, la funci3n de estos es la siguiente, PEN2 situado en los peroxisomas al producirse la ruptura celular se activa y cataliza una reacci3n en la que se produce una toxina, esta toxina es transportada a la membrana por PEN1 hasta la membrana celular donde est3 PEN3, formando parte de la papillae y haciendo que esta sea t3xica, matando as3 al pat3geno, este proceso se muestra en la **Figura 10.**

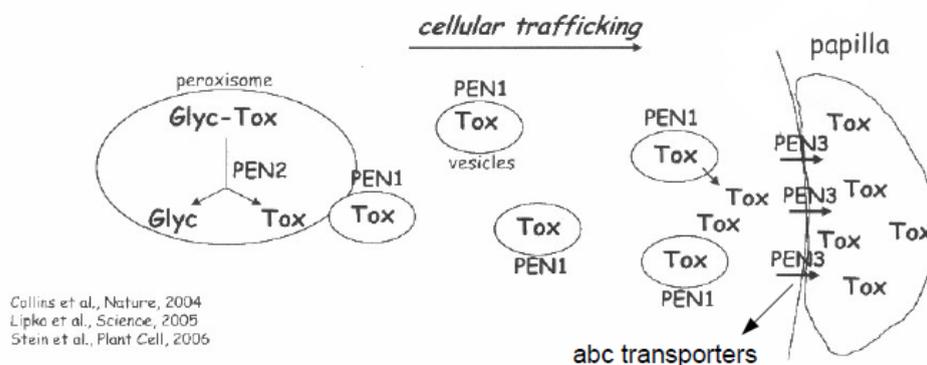


Figura 10. Diagrama acci3n genes PEN.

- *Resistencia basal*, esta resistencia se produce cuando la energ3a empleada en las respuestas defensivas es grande, se dar3a en el caso que no se produjera

resistencia *non host tipo 2*, viene promovida por los PAMPs por lo que no es una respuesta específica. Esta respuesta es muy interesante ya que se puede estimular, haciéndola más rápida y efectiva. En la **Figura 11**. se representa la resistencia basal.

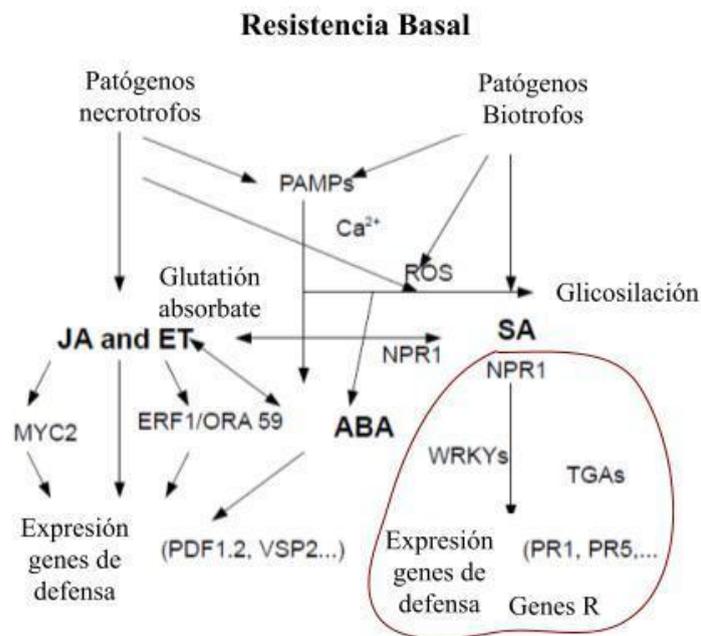


Figura 11. Diagrama resistencia basal.

- *Resistencia mediante genes R*, la resistencia viene mediada por estos genes que sintetizan proteínas R las cuales están explicadas en el apartado 1.5.2. Sistemas de defensa inducibles.
- *Resistencia indirecta*, esta es una de las resistencias menos estudiadas, y consiste en que la planta mediante diversos mecanismos, favorece la llegada de enemigos naturales de los patógenos que la están atacando.

1.5. Mecanismos de defensa de las plantas

Las plantas son organismos eucariotas multicelulares fotosintéticos sin capacidad motora que llevan poblando la tierra unos 472 Ma. Durante este gran periodo de tiempo se han tenido que enfrentar a diferentes estreses, tanto bióticos (virus, hongos, bacterias, insectos...), como abióticos (sequía, altas temperaturas, salinidad...). Esto ha hecho que las plantas desarrollen diversas estrategias para hacer frente a estos sucesos y sobrevivir a ellos.

Las plantas no tienen un sistema inmune adaptativo como los seres humanos, pero tienen un sistema de inmunidad innata mediante el cual vigilan y reconocen moléculas externas a ellas, este sistema es denominado sistema “zigzag”.

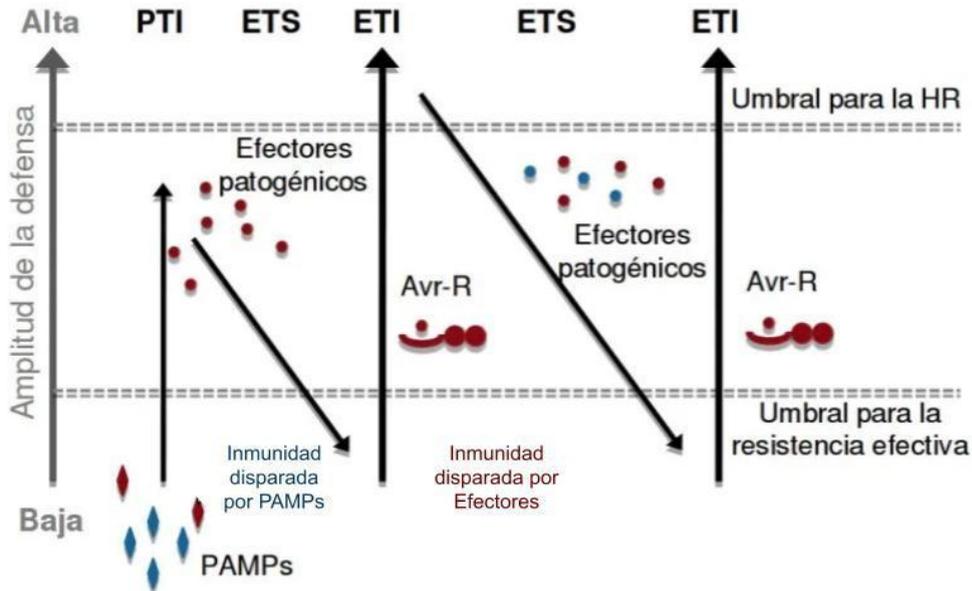


Figura 12. Representación gráfica del modelo de defensa de las plantas “zig zag”.

El primer nivel del sistema inmune de las plantas se activa mediante el reconocimiento de los PAMPs o MAMPs por los receptores transmembrana de reconocimiento de patrones o PRR. Los PAMPs son moléculas presentes en un gran rango de patógenos, las cuales no tienen actividad, algunos ejemplos son la flagelina de las bacterias o la quitina de los hongos.

Si el patógeno logra superar esta primera línea de defensa ya sea mediante la introducción de efectores que tienen la capacidad de suprimir la inducción del PTI o la capacidad de detoxificar los productos sintetizados por este tipo de sistema inmune, se activa una segunda defensa mediante el reconocimiento de estos efectores, los cuales desencadenan una defensa específica hacia ese patógeno.

La diferencia entre los PAMPs y los efectores es que estos últimos son funcionales y llevan a cabo cierta actividad, siendo esta actividad la que le dice a la planta el estilo de vida del patógeno adaptando el sistema de defensa.

1.5.1. Sistemas de defensa constitutivos

Estos sistemas son la primera barrera que encuentran los patógenos al colonizar la planta, estas defensas constitutivas no se activan al reconocer la presencia de un

patógeno, sino que están continuamente activas. La función principal es evitar que el patógeno llegue a entrar a la célula. Estos sistemas se pueden dividir en:

- *Físicos*, como los tricomas (son apéndices de la epidermis que entre otras, sus funciones principales son la absorción de agua, la regulación de la temperatura, la protección contra agentes abrasivos y percepción de estímulos), la cutícula (es una capa cerosa en la hoja que funciona como barrera para la entrada de bacterias y hongos) y la pared celular (es una capa, mayoritariamente compuesta de celulosa que limita el movimiento entre las células, eficiente contra hongos, en el caso de las bacterias no es útil).
- *Químicos*, como las fitoanticipinas, las cuales son unas sustancias preformadas que se activan en el momento de la infección y cuya función suele ser antimicrobiana. Algunas de las fitoanticipinas presentes en los vegetales son, las saponinas (algunos ejemplos son Avenacin A-1, Tannins, Steroids, Glycoalkaloids, Glucosinolates) y los glucosinolatos como la comúnmente denominada bomba mostaza representada en la **Figura 13**. que al entrar en contacto con la glucosa que se libera al haber una rotura de la pared se descompone en tres compuestos bioactivos tóxicos.

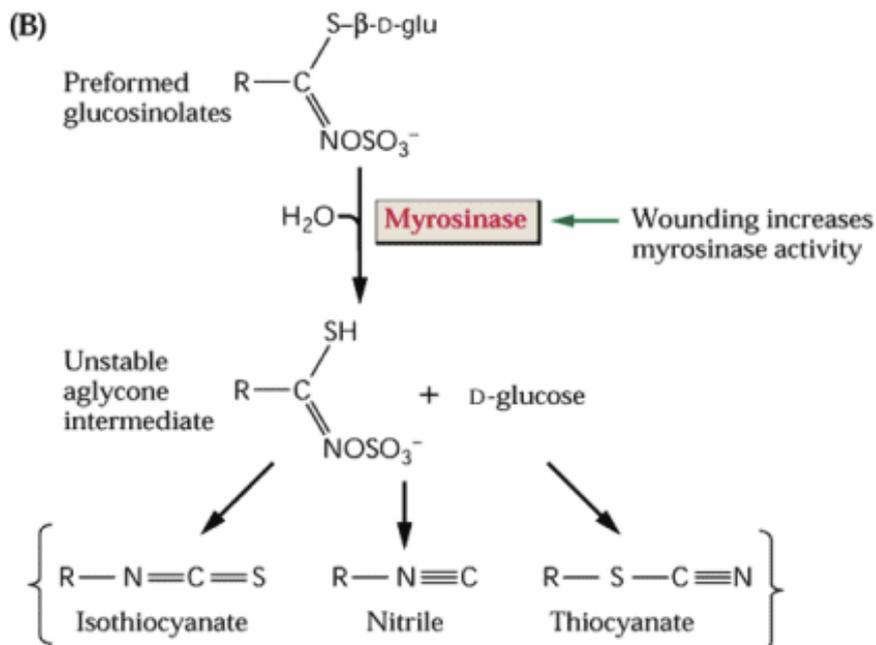


Figura 13. Bomba mostaza.

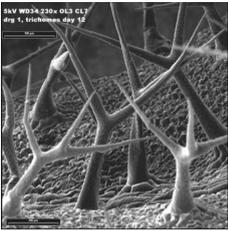
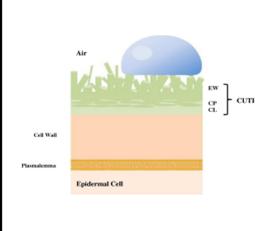
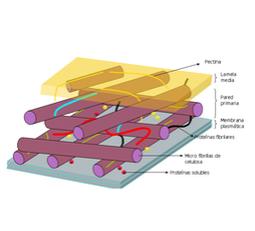
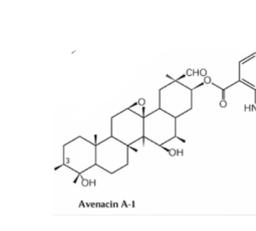
Sistemas defensa constitutivos			
Físicos			Químicos
Tricomas	Cutícula	Pared celular	Fitoanticipinas
			

Tabla 5. Tabla resumen sistemas de defensa constitutivos.

1.5.2. Sistemas de defensa inducibles

Estos sistemas se activan mediante el reconocimiento de los PAMPs o efectores por la planta, la cual puede activar tanto barreras físicas para ralentizar la expansión del patógeno, como sustancias químicas para combatir a este e incluso llegando a emitir compuestos volátiles para avisar a otras zonas de la planta y a las plantas de alrededor, acelerando así la reacción de estas otras partes frente al patógeno. Algunos de los sistemas inducibles son los siguientes:

- *Refuerzo de las paredes celulares.* Este fenómeno es uno de los primeros en activarse, este engrosamiento se produce por una acumulación de papillae la cual está formada por callosa, lignina, especies ROS, proteínas de membrana y tinoninas. Como se puede observar en la Imagen x. la acumulación de papillae cierra los plasmodesmas dificultando el movimiento entre células.

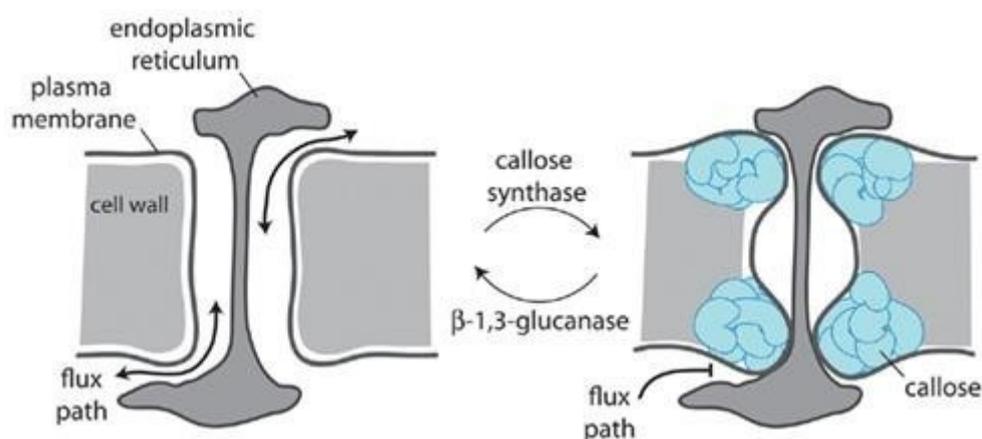


Figura 14. Refuerzo de la pared celular mediante la acumulación de callosa

- *Respuesta hipersensible*. Es la primera línea de defensas activas, creando unas condiciones desfavorables para el patógeno y se produce en zonas localizadas. La respuesta hipersensible viene dada por la acumulación de especies ROS las cuales son producidas en la membrana endoplasmática por NADPH oxidasas. Las ROS además de ser tóxicas para los patógenos, son promotoras de la acumulación de papillae en las paredes celulares, también activan en células más distantes la transformación del ácido benzoico a ácido salicílico el cual genera la expresión de genes de resistencia.

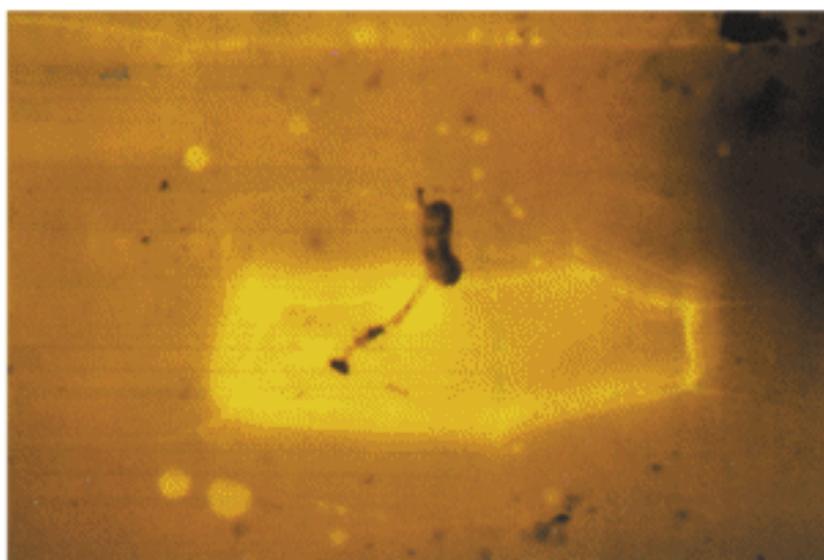


Figura 15. Acumulación de peróxido de hidrógeno

- *Proteínas PR*. Las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) se han llamado así ya que son unas proteínas determinadas que sintetiza la planta cuando está siendo atacada por un patógeno. La sintetización de estas proteínas viene regulada por diversas hormonas como el SA. En la siguiente tabla se detallan algunas de las proteínas PR descubiertas y su actividad (5).

Familia	Actividad
PR-1	Antifúngica
PR-2	β -1,3 glucanase
PR-3	Citinasa (glycanohydrolase familia 19)
PR-4	Citinasa (?)
PR-5	Antifúngica (thaumatin-like)
PR-6	Inhibidor de proteasa
PR-7	Proteasa
PR-8	Citinasa (glycanohydrolase familia 18)
PR-9	Peroxidasa

PR-10	Ribonucleasa
PR-11	Citinasa (glycanohydrolase familia 18)

Tabla 6. Proteínas PR y sus funciones.

- *Fitoalexinas.* Son compuestos de bajo peso molecular con un efecto antimicrobiano que se acumulan de forma muy rápida en la zona de infección del patógeno. Son compuestos como las fitoanticipinas pero a diferencia de estas, las fitoalexinas no están presentes en la planta antes de la infección sino que se sintetizan en el momento en el que un factor externo las induce, como pueden ser los PAMPs, los estreses físicos o químicos o los electores. Las estructuras moleculares de algunas de las fitoalexinas más comunes se muestran en la **Figura 16.**

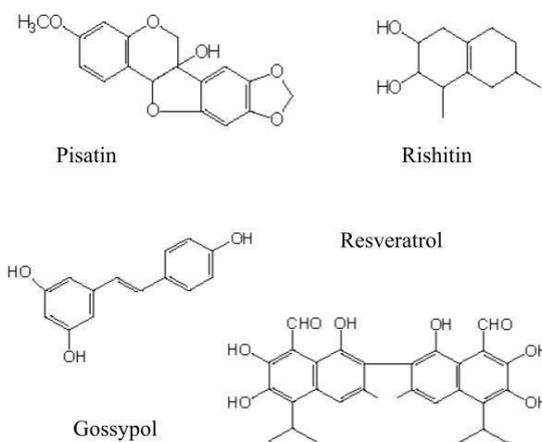


Figura 16. Estructuras moleculares fitoalexinas.

Sistemas defensa inducibles			
Refuerzo pared celular	HR	Proteínas PR	Fitoalexinas
<p>Diagram illustrating cell wall reinforcement. Labels include: Zona del cuello, Pared celular, Plasmodesmo, Calosa, Desmotúbulo, Pasadizo de paso, and Membrana plasmática.</p>			

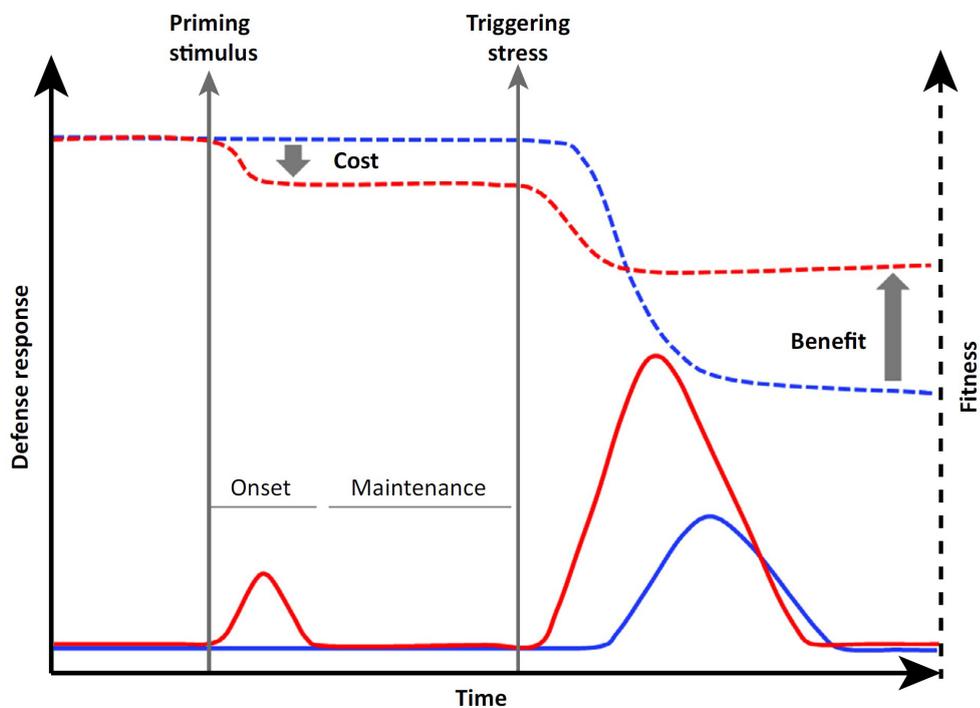
Tabla 7. Tabla resumen sistemas de defensa inducibles.

1.5.3. Priming

El concepto de priming es un término bastante reciente, el cual consiste en que a través de un estímulo externo se induce a la planta en un estado fisiológico el cual le permite

responder de una manera más rápida y/o fuerte al ataque de patógenos, insectos o estreses bióticos. Este puede ser inducido por patrones moleculares de microbios, elictores, microbios beneficiosos como las micorrizas, por heridas y por diversos compuestos ya sean naturales o sintéticos.

Como todo proceso, el priming tiene un coste energético que influye en el crecimiento de la planta, en la **Figura 16** se observa el efecto del priming, el color azul hace referencia a la planta sin priming y el rojo la planta inducida por priming. En esta gráfica se representa en la zona inferior se muestra la respuesta defensiva y se observa un pico tras el estímulo de priming en la línea roja y luego una vuelta a la “normalidad” y en el momento en el que aparece el estrés se observa que en la planta inducida por priming se genera un pico de defensa mayor y antes que el pico de defensa de la planta sin priming, por otro lado en la parte superior se representa el crecimiento de las plantas, en el caso de la planta con priming se observa un descenso tras el estímulo priming, pero en el momento de estrés se observa que el descenso en el crecimiento de la planta con priming es mucho menor que el descenso de la planta sin estímulo de priming obteniendo un balance positivo. Por lo que aunque el estímulo de priming tenga un coste, el beneficio obtenido en el momento que se presente un estrés es mucho superior.



Trends in Plant Science

Figura 16. Comparación planta inducida priming (Rojo) con planta sin priming (azul).

1.7. Respuestas hormonales

Todos los procesos fisiológicos que se dan en las plantas vienen dados por un balance hormonal, el cual dicta cada proceso que se produce en la planta, a continuación comentaremos las funciones de las principales hormonas así como sus rutas de biosíntesis y su estructura molecular.

ABA (6)

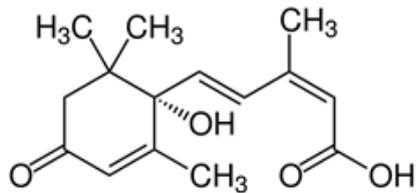
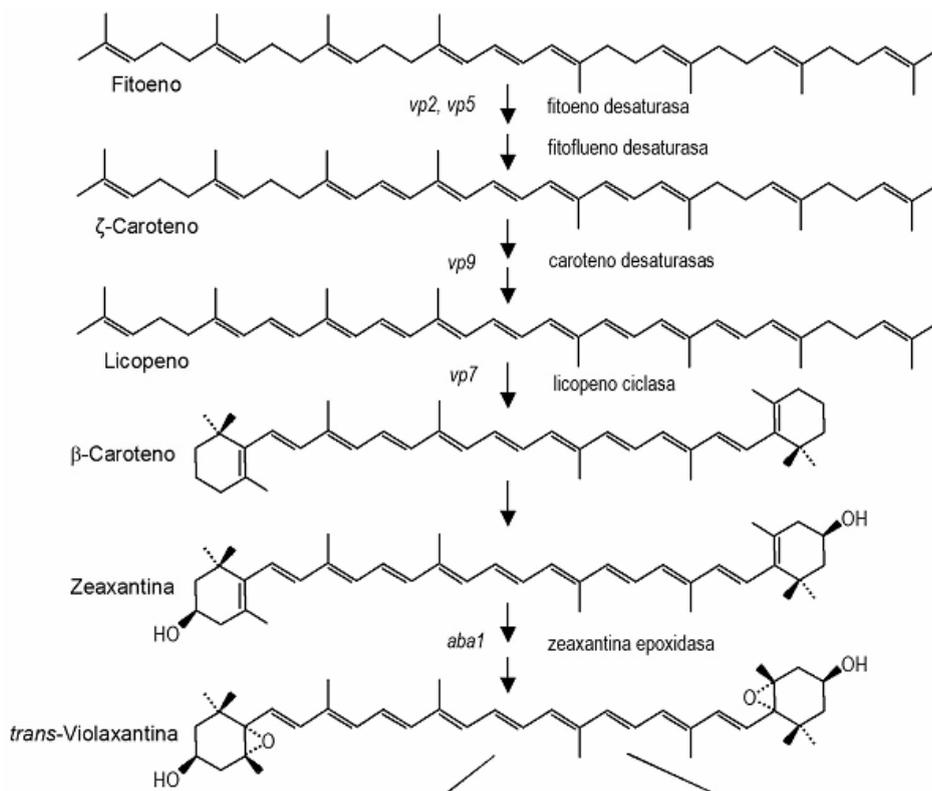


Figura 17. Estructura ABA

El ácido abscísico o ABA es un sesquiterpenoide de 15 carbonos. La síntesis puede darse a través de dos rutas, la ruta del ácido mevalónico (MVA), la cual tiene lugar en el citosol y la ruta del metileritritol fosfato (MEP), que se localiza en los cloroplastos. Se ha determinado que la ruta MEP es la ruta principal de producción de ABA en las plantas superiores. Esta consiste en la transformación del gliceraldehído 3-fosfato junto al piruvato en el cloroplasto mediante diversas reacciones hasta obtener xantoxina, la cual sale al citosol y tras varias reacciones se transforma en ABA.¹



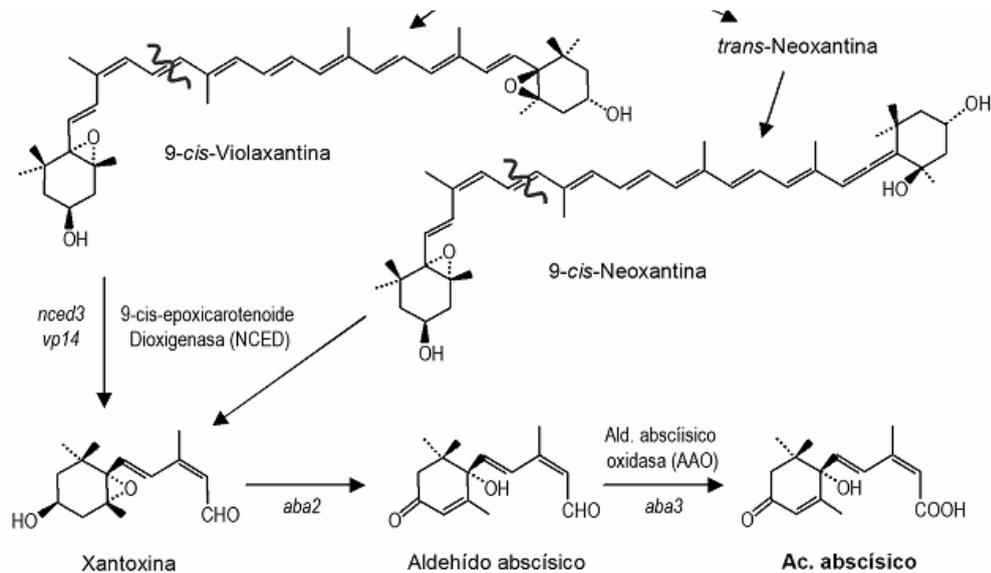


Figura 18. Ruta síntesis ABA

El ABA tiene una gran diversidad de funciones, en relación con la defensa vegetal interviene en la abscisión de hojas, flores y frutos ya que se ha visto que la presencia de esta hormona promueve la senescencia estimulando la presencia de etileno (principal regulador de la abscisión). A un nivel intracelular la presencia elevada de ABA acelera la senescencia mediante la estimulación de la síntesis de enzimas hidrolíticas que degradan la clorofila y el aparato fotosintético haciendo que las hojas infectadas caigan y dificultando así la expansión del patógeno a otras zonas de la planta, además de que en el caso de los patógenos biotrofos obligados, al necesitar material vegetal vivo para sobrevivir, al tirar las hojas infectadas dificultan su supervivencia. Aunque también se ha observado tiene una actividad antagónica con las hormonas responsables de la interacción planta patógeno, por lo que aunque sea una función interesante el peso antagónico que tiene frente a estas hormonas es superior al beneficio que se obtenga de esta.

La función principal del ABA es el cierre estomático ante el estrés hídrico, altas temperaturas y salinidad. El cierre estomático viene causado por una serie de eventos, primero se produce la apertura de canales de Ca^{2+} y despolarización temporal de la membrana, esta despolarización promueve la apertura de canales Cl^- inhibiendo los canales K^+ de entrada y las bombas de protones-ATPasas, el flujo neto de cargas negativas produce una despolarización de la membrana y un incremento del pH citosólico lo cual genera la apertura de los canales K^+ de salida generando una pérdida de iones K^+ ocasionando una disminución de la turgencia de las células guarda y por

ende generando el cierre estomático dificultando la entrada de ciertos patógenos, como pueden ser las bacterias.

Otro efecto del ABA tiene que ver con la generación de la dormición de yemas y semillas reduciendo en crecimiento, en el caso de la dormición de las semillas viene dado por que el ABA bloquea la síntesis de α -amilasa la cual es necesaria para el crecimiento del embrión. En lo relativo al crecimiento vegetativo la presencia de bajos niveles de ABA reduce el crecimiento de la parte aérea, mientras que mantiene el crecimiento de la parte radicular, mientras que en grandes cantidades inhibe el crecimiento tanto de la parte aérea como de la radicular.

SA (6)

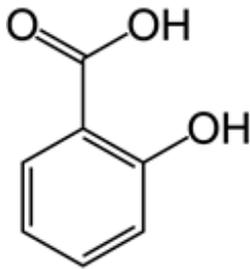
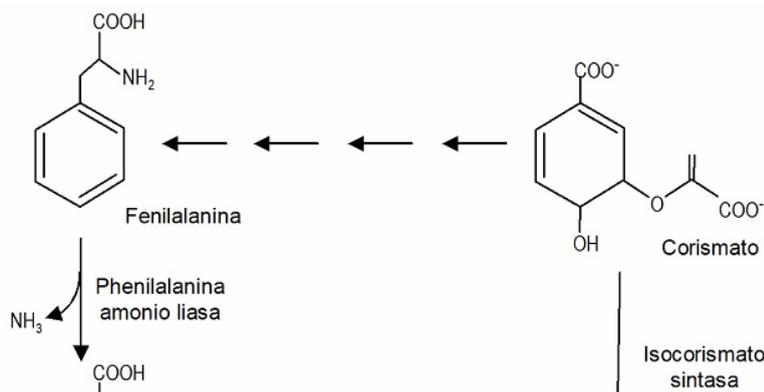


Figura 19. Estructura SA

El ácido salicílico o SA es un compuesto fenólico simple, el cual consiste en un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. La síntesis de esta hormona principalmente se da partir de la fenilalanina, pero se vio que toda la cantidad de SA presente en los tejidos no podía generarse únicamente mediante esta ruta por lo que se han sugerido otras rutas alternativas como la vía del ácido corísmico mediante las enzimas isocorismato sintasa (ICS) y la isocorismato piruvato liasa (IPL), se ha observado que en plantas de *A.thaliana* que se sobre expresan estas dos enzimas se produce un incremento en la cantidad de SA, aunque falta más investigación sobre las rutas de SA.



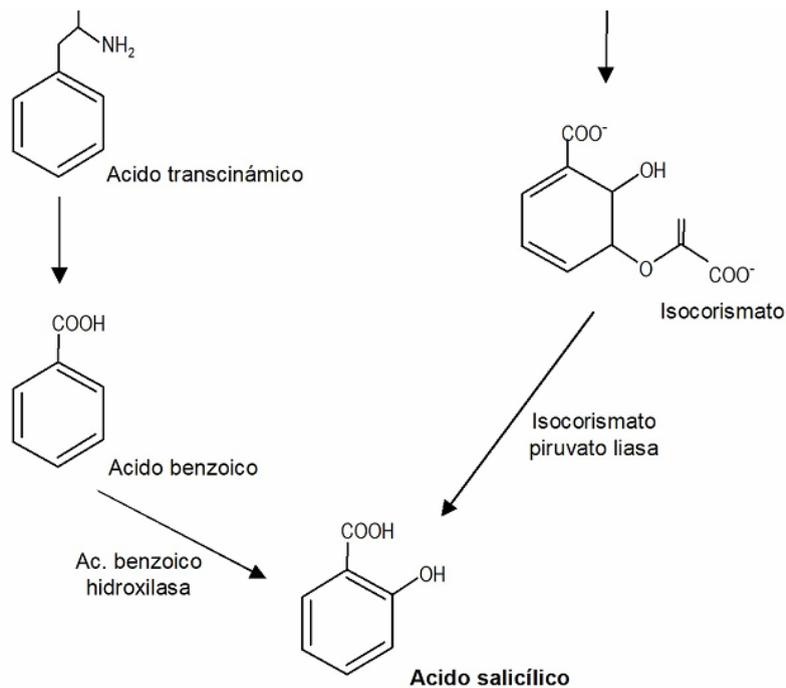


Figura 20. Ruta de síntesis SA

La función principal SA se ha visto que sobre todo está implicado en la señalización de defensas locales y regula la respuesta sistémica adquirida (SAR), este fenómeno consiste en que tras la infección se produce un aumento de la protección y la resistencia frente a posteriores infecciones. Esta acumulación de SA en la zona de la infección generaría la movilización de una señal sistémica de metil-salicilato, la cual es responsable de la SAR y generaría la expresión de genes de resistencia PR en otras zonas de la planta. La transcripción de estos genes PR viene regulada por los factores TGA's y WRKY's con la proteína NPR1 la cual está activada por SA. Algunos de estos genes PR como el NDR1 promueven una respuesta hipersensible la cual genera la muerte celular, siendo esto favorable ante patógenos biotrofos. Por lo que podríamos decir que el SA está directamente implicado en la protección de la planta frente al patógeno biotrófico.

JA (6)

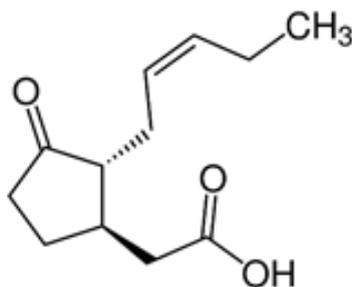


Figura 21. Estructura JA

El ácido jasmónico o JA y sus derivados denominados JA's son compuestos de origen lipídico. La síntesis de esta hormona se produce a través de la ruta de los octadecanoides, esta ruta consiste en la transformación de los ácidos grasos no saturados mediante fosfolipasas a ácido linoleico y linolénico, siendo este último el factor limitante, mediante diversas enzimas hasta obtener JA, a partir de este mediante el jasmonato metil transferasa se sintetiza el metil-jasmonato.

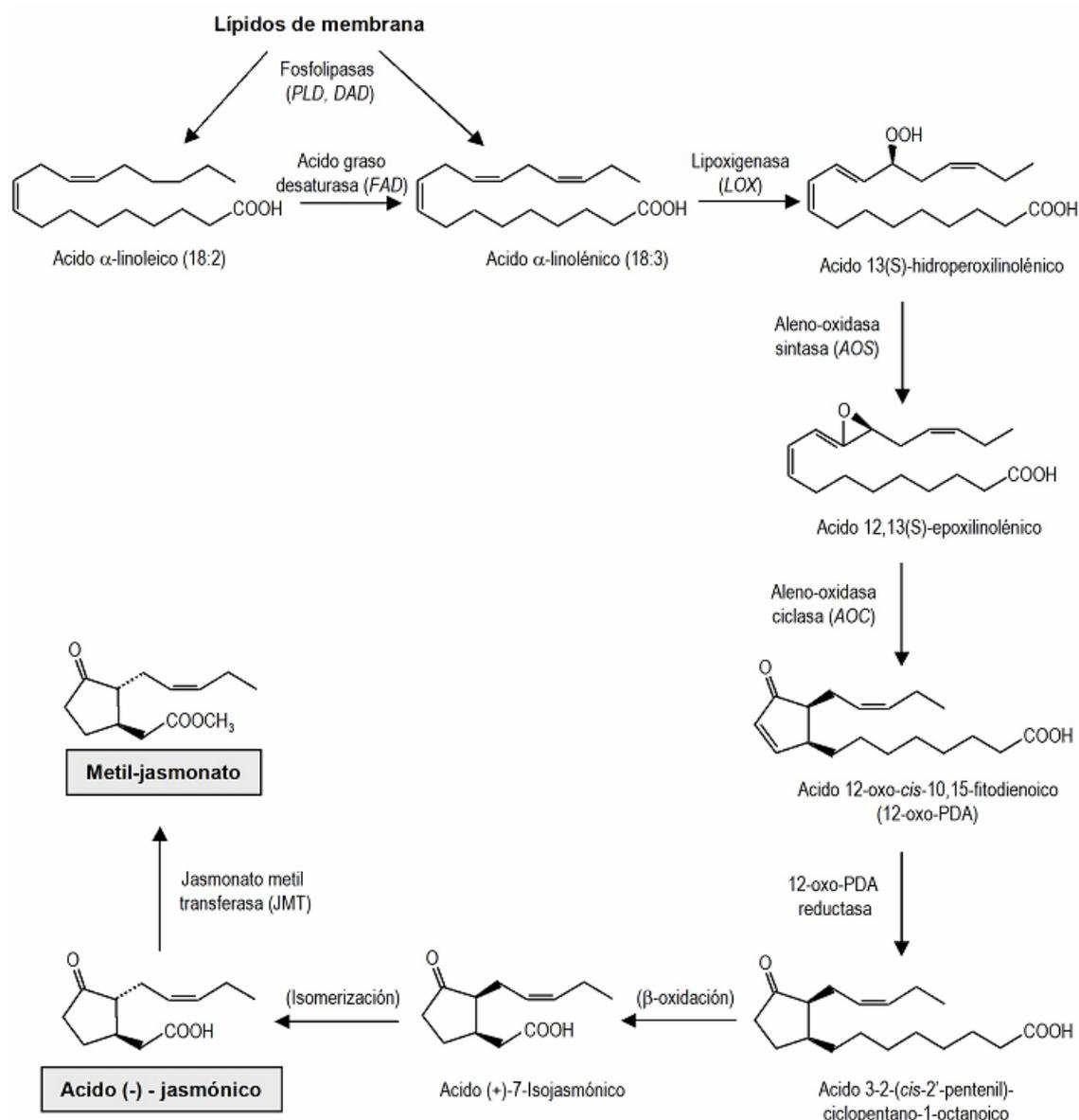


Figura 22. Ruta de síntesis de JA.

Una función del JA a destacar es que gracias al metil-jasmonato, compuesto volátil, en el momento de estrés la planta segrega estos volátiles y sirven de señal de alarma para las plantas cercanas.

También promueven la activación de diversos genes de defensa como puede ser el gen PDF1.2 y VSP2, siendo el primero expresado ante ataques de herbívoros al activarse el factor de transcripción MYC2 y el segundo frente a patógenos necrotróficos a causa de la liberación del factor ORA59 o ERF-1.

En lo relativo a la funcionalidad del JA en la defensa vegetal hay que destacar su regulación negativa del SA, por lo que cuando suben los niveles de JA se reducen los de SA y al revés.

Otras funciones de JA son la dormancia de las semillas, el cierre estomático, promueven la senescencia de hojas y promueven la síntesis de etileno.

IAA (6)

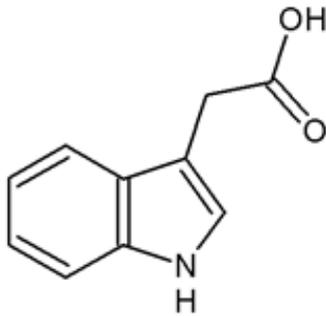
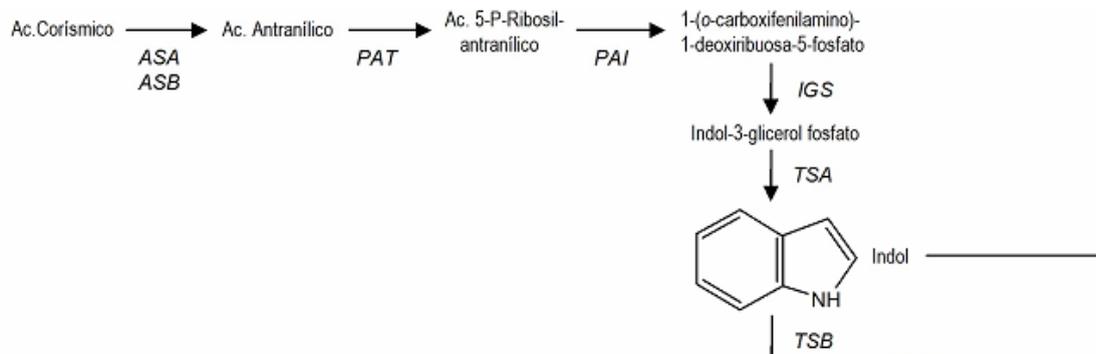


Figura 23. Estructura IAA

El ácido indolacético o IAA es un compuesto ácido heterocíclico, perteneciente al grupo de hormonas vegetales denominadas auxinas. La síntesis de las auxinas, aunque se producen en todos los tejidos, se encuentran en mayores cantidades en los tejidos que presentan un crecimiento activo. Las rutas de síntesis que usan las plantas son dos, una dependiente del triptófano y otra que no depende de este compuesto, la primera es la más importante y la más estudiada, por lo cual de la que mayor cantidad de información se tiene.



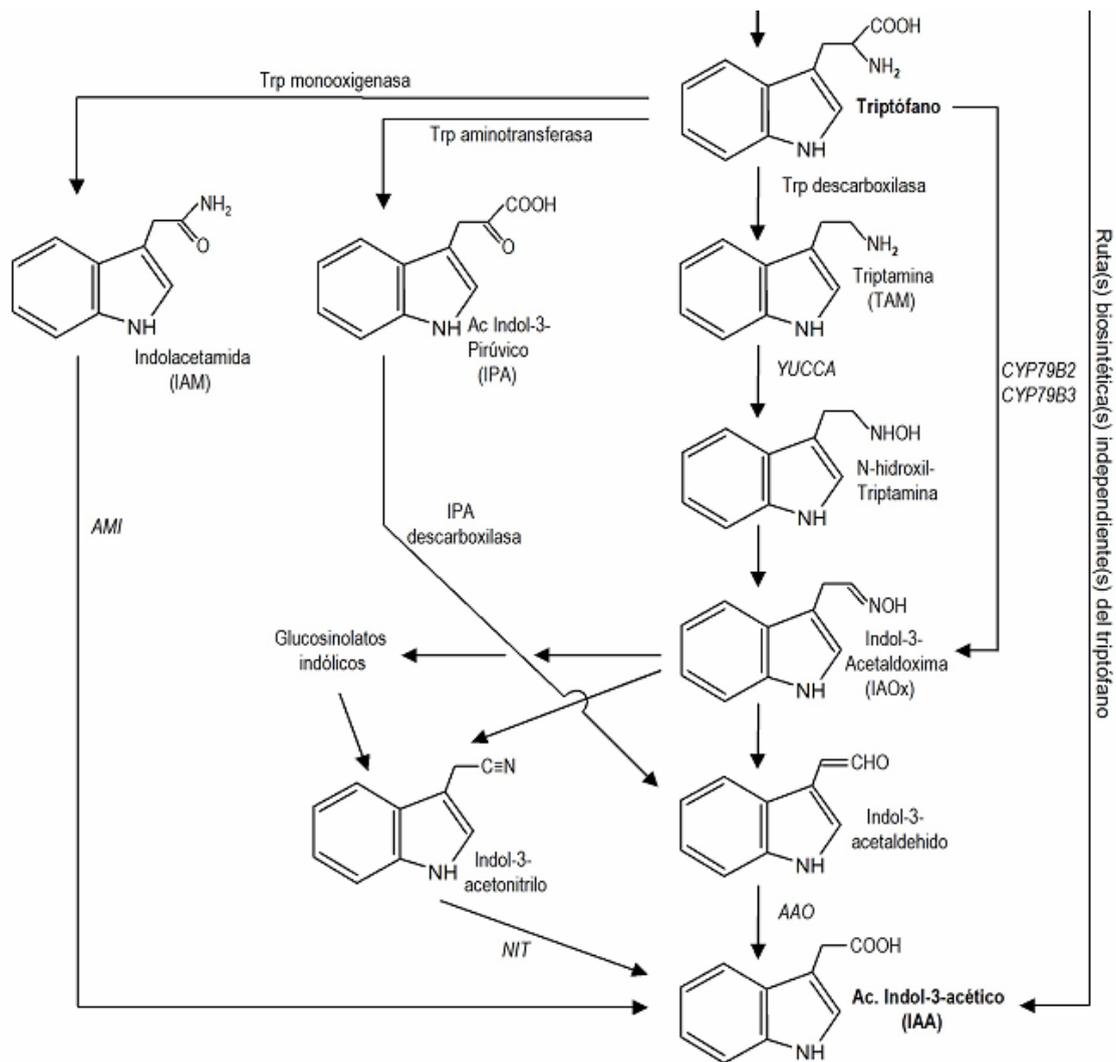


Figura 24. Ruta síntesis IAA.

La función principal de las auxinas es el crecimiento y la diferenciación celular, sobre todo influyendo en la rizogénesis, estimulando la división de las células localizadas en el periciclo, provocando la formación de raíces laterales. También influye en la dominancia apical ya que se presenta un gradiente negativo desde el ápice primario hacia la base, reprimiendo el crecimiento de los brotes axilares.

Otro efecto importante es el papel antagónico que tiene en la abscisión de órganos, retrasando especialmente la caída de hojas, flores y frutos jóvenes. Este efecto se da por la translocación de las auxinas hacia la base del pecíolo inhibiendo la función del etileno, generando sé un balance entre el etileno y las auxinas, cuando aumenta la presencia de una de las hormonas, la presencia de la otra se reduce, en las hojas conforme más viejas menor cantidad de auxinas y mayor cantidad de etileno.

Favoreciendo esta multiplicación celular a los patógenos biotrofos ya que de esta forma tienen una renovación continua de células de las que alimentarse.

Las auxinas también regulan los tropismos, ya que en el caso del fototropismo, las auxinas en vez de trasladarse hacia la base, se transportan lateralmente hacia el lado sombreado, causando una aceleración del crecimiento en el lado sombreado provocando un crecimiento hacia la luz. Pasando lo mismo en el caso de la geotropía.

I3CA (7-8)

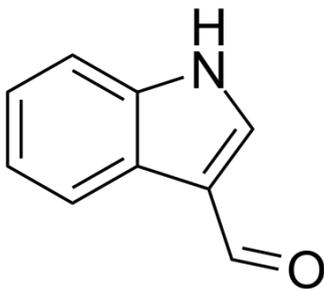


Figura 25. Estructura I3CA

El ácido indol-3-carboxílico o I3CA es un derivado indólico perteneciente al grupo de hormonas vegetales denominadas auxinas. La síntesis mayoritaria de este compuesto viene dada principalmente por los genes Cytochrome P450 (CYP) 71B13 (CYP71A13) y *A.thaliana* aldehyde oxidase1 (AAO1).

I3CA se ha observado que está implicado en la defensa vegetal contra hongos, interviniendo en la señalización o regulación. La función principal observada es la implicación del I3CA en la acumulación de callosa en las paredes vegetales.

También se ha observado en *A.thaliana* que el I3CA junto ICHO forman un sustrato para la formación de la camalexina y la reacción es catalizada por la proteína GH3.5, la camalexina es una fitoalexina, la cual tiene un papel importante en la defensa vegetal.

OPDA (precursor JA) (9)

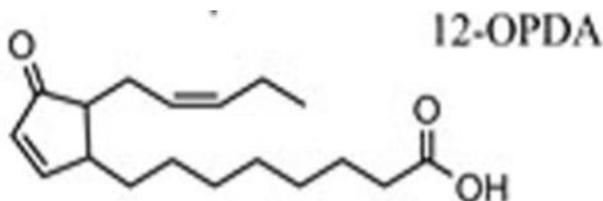


Figura 26. Estructura OPDA

El ácido 12-oxo fitodienoico o OPDA es una oxilipina que deriva de ácidos grasos poliinsaturados, también se puede encontrar en forma metilada OPDAME. Se ha determinado que la síntesis de oxilipinas se induce en la planta como respuesta a la infección por diversos patógenos, generando así su acumulación. La síntesis de OPDA en el cloroplasto y su transformación a JA en el peroxisoma así como las enzimas implicadas en esta ruta metabólica se muestra en la **Figura 27**.

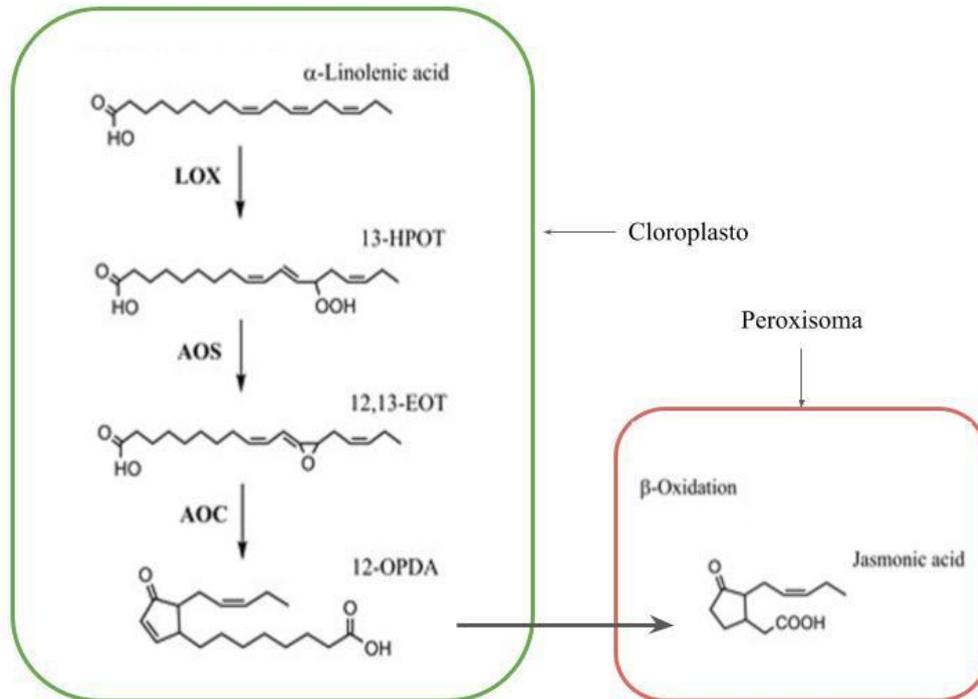


Figura 27. Ruta síntesis y transformación del OPDA.

La función principal de OPDA es de sustrato en la ruta de biosíntesis de jasmónico, por lo que las características principales de este son similares a las de JA, siendo especialmente efectivo contra patógenos necrotrofos.

Citoquininas - Kinetina y 6 Benzylaminopurina (6)

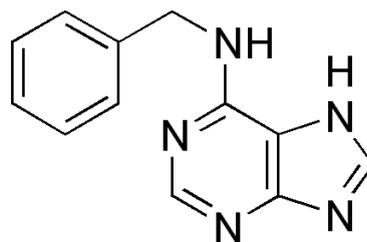
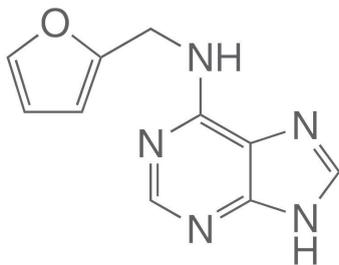


Figura 28. Estructura Kinetina. **Figura 29.** Estructura 6 Benzylaminopurina

La kinetina fue la primera citoquina descubierta y la 6 Benzylaminopurina o BAP es una citoquinina sintética de primera generación.

La síntesis de las citoquininas pueden ser de origen natural o sintético, en el caso de las naturales, son las producidas por las plantas y vienen producidas vía DMAPP (dimetil pirofosfato) y 5'-AMP (adenosina 5' monofosfato) lo cual se puede ver representado en la **Figura 30**.

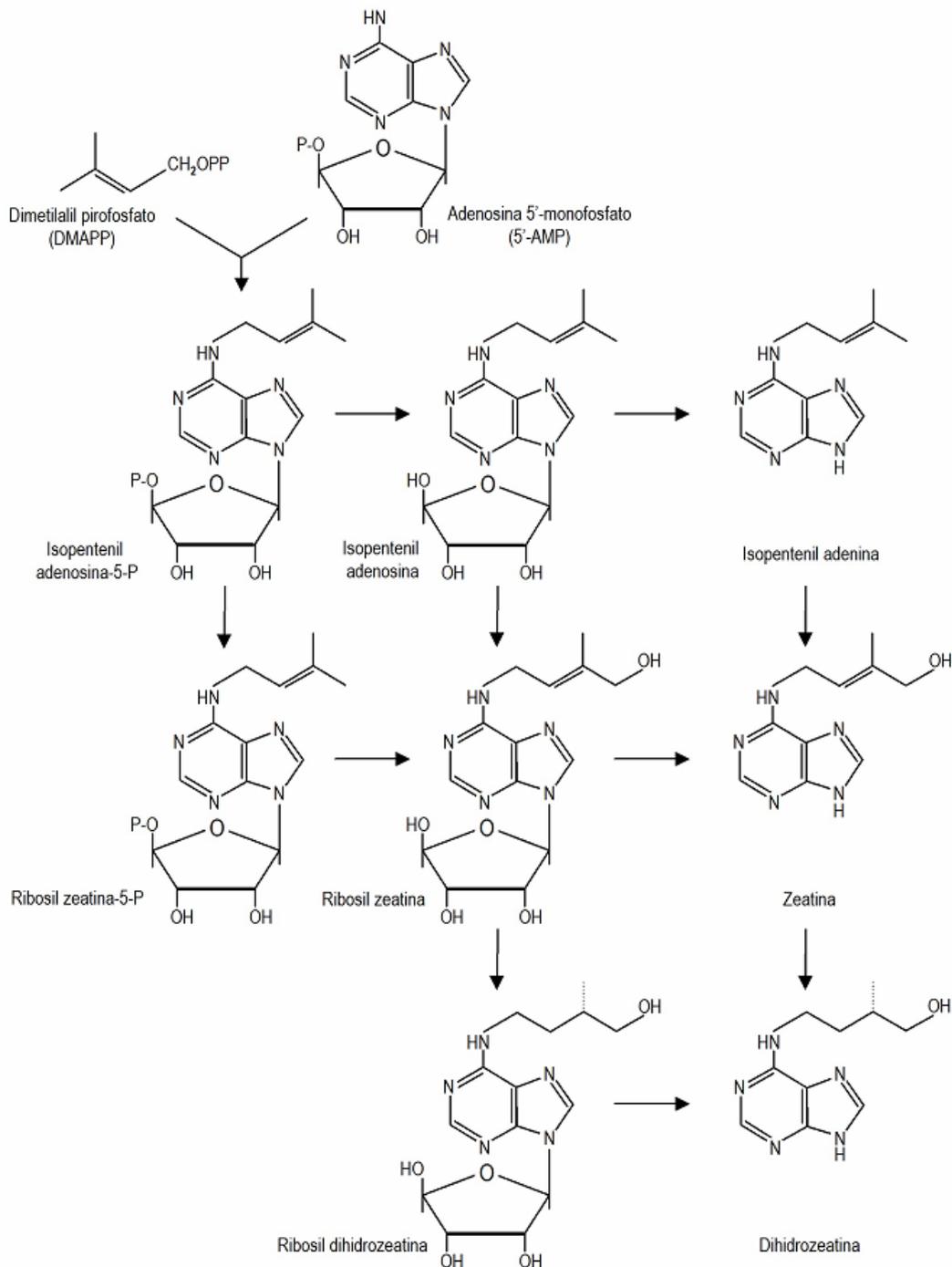


Figura 30. Ruta síntesis citoquininas.

La función principal de las citoquininas es promover la división celular, en relación con esta función las citoquininas provocan la iniciación de brotes ya que reducen o anulan la dominancia apical favoreciendo así a la brotación lateral, también influye en la organogénesis dado que junto a las auxinas promueven la producción de tejidos no organizados denominados callos a partir de los cuales se puede regenerar la planta completa con el correcto balance hormonal y también posibilita la androgénesis, la cual consiste en la obtención de individuos haploides derivados de polen, siendo esta última herramienta de gran importancia en la mejora genética vegetal. Siendo esta función contraproducente al tratarse de patógenos biotrofos.

Otra de sus funciones es el retraso de la senescencia manteniendo durante más tiempo activas y funcionales las clorofilas lo cual para la planta implica la conservación de la síntesis de proteínas y consiguiente transcripción de varios genes ya que para estos procesos es necesaria la energía, este fenómeno sucede por que las citoquininas en una zona provoca un efecto “sumidero” atrayendo materias primas como los AA’s permitiendo la síntesis de las proteínas.

Como se ha podido constatar la defensa de las plantas frente a diversos estreses, viene dada por las concentraciones de las diversas hormonas y la interacción entre ellas como se puede observar en la **Figura 31**. en la que se representa la relación de activación o supresión que hay presente entre los diversos tipos de hormonas, este cambio en el contenido hormonal viene regulado por la interacción del medio con la planta, en nuestro caso de interés nos centraremos en los cambios producidos por la interacción del patógeno con la planta.

Como se puede observar en la **Figura 31** los patógenos necrotrofos activan las rutas de defensa del JA y del ET y se ha observado una regulación negativa entre las giberelinas y la ruta de defensa contra necrotrofos. En la defensa contra los patógenos biotrofos se activa principalmente la ruta de el SA, también se ha observado una interacción positiva de las giberelinas con la ruta de defensa contra biotrofos y una regulación negativa de esta ruta con las auxinas, el ABA y con la ruta del JA. Aunque por lo general la activación de las rutas es como lo comentado anteriormente, en algunos casos, los patógenos son capaces de engañar a la planta y hacer que active rutas antagónicas a las responsables de la defensa contra él ya sea bloqueando la ruta responsable de la defensa o activando las rutas antagónicas directamente, como por ejemplo *Pseudomonas*

syringae una bacteria biotrófica, activa las rutas del ABA y de las auxinas, las cuales regulan negativamente la ruta del SA responsable de la defensa contra biotrofos.

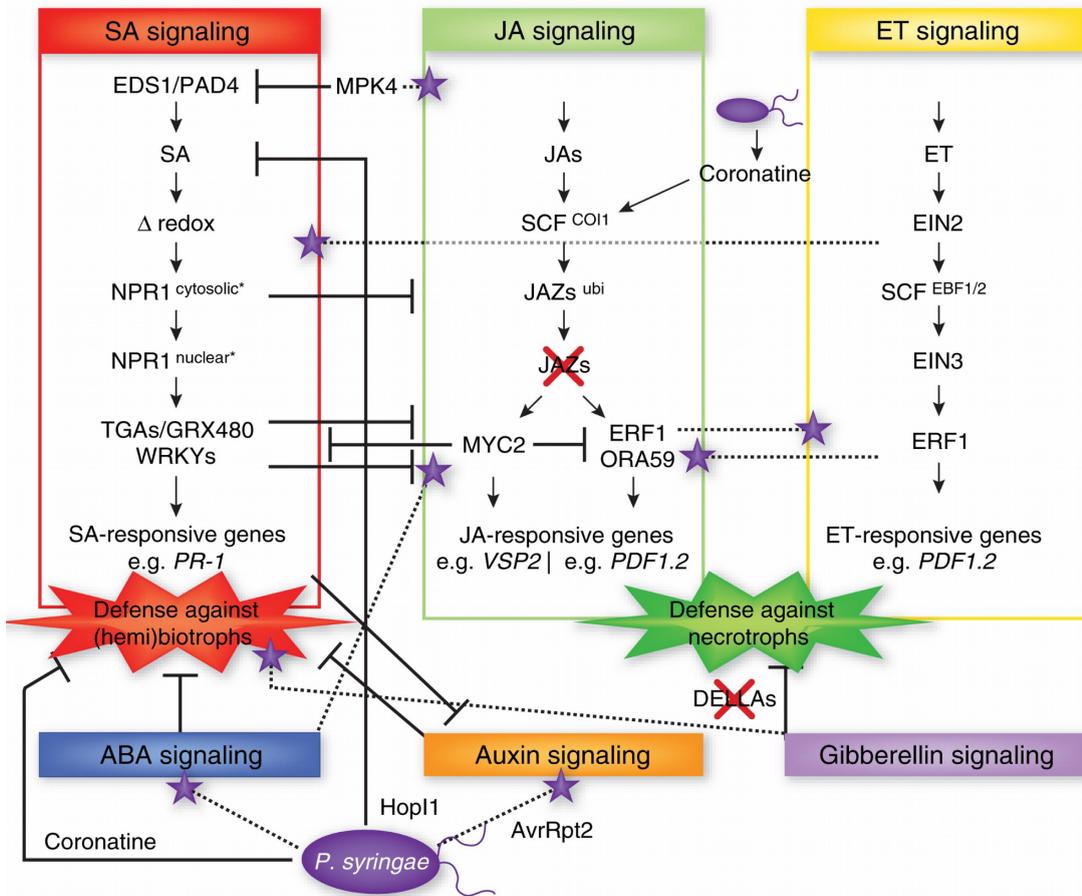


Figura 31. Resumen de la interacción hormonal en la defensa vegetal.

METODOLOGÍA

2. Metodología

2.1. Tratamientos utilizados

BABA

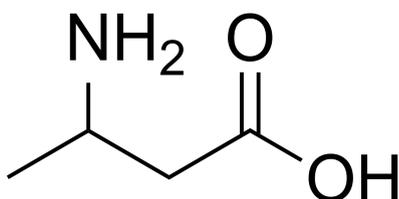


Figura 32. Estructura BABA.

El BABA o ácido β -aminobutírico es un aminoácido no proteico, inicialmente no se sabía si el BABA tenía una función biocida o fomentaba la resistencia de la planta, pero con diversos estudios se vio que el BABA no producía toxicidad en los cultivos de patógenos. Por este motivo se determinó que tiene un efecto distintivo como condicionante de los mecanismos de defensa de la planta los cuales, conducen a una respuesta más rápida al ataque de los patógenos y que dan lugar a una interacción incompatible, es decir, HR, necrosis de arrastre y formación de papillae (18). Esta respuesta ha sido estudiada en diversas especies y contra diversos patógenos, algunos ejemplos se muestran en la **Tabla 8**.

Planta	Protección contra
Guisante (<i>Pisum sativum</i>)	<i>Aphanomyces euteiches</i>
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>
	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>
	<i>Botrytis cinerea</i>
Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>)	<i>Verticillium dahliae</i>
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	<i>Peronospora tabacina</i>
	<i>Tobacco mosaic virus</i>
Pimienta (<i>Capsicum annum</i>)	<i>Phytophthora capsici</i>
	<i>Colletotrichum coccodes</i>
Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	<i>Phytophthora infestans</i>
	<i>Meloidogyne javanica</i>
	<i>Fusarium oxysporum fsp. lycopersici</i>
	<i>Botrytis cinerea</i>
Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	<i>Plasmopara viticola</i>

Melón (<i>Cucumis melo</i>)	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>
Girasol (<i>Helianthus annuum</i>)	<i>Plasmopara helianthi</i>
	<i>P. halstedii</i>
Broccoli (<i>Brassica oleracea var italica</i>)	<i>Peronospora parasitica</i>
	<i>Alternaria brassicicola</i>
Colinabo (<i>B. oleracea var gongylodes</i>)	<i>Peronospora parasitica</i>
	<i>Alternaria brassicicola</i>
Corn (<i>Zea mays</i>)	<i>Fusarium moniliforme</i>
Mijo (<i>Pennisetum typhoides</i>)	<i>Sclerospora graminicola</i>
Coliflor (<i>B. oleracea var botrytis</i>)	<i>Peronospora parasitica</i>
	<i>Alternaria brassicicola</i>
Patata (<i>Solanum tuberosum</i>)	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Peronospora parasitica</i>
	<i>Pseudomonas syringae pv tomato</i>
	<i>Botrytis cinerea</i>

Tabla 8. Tabla de ejemplos de resistencia inducida por BABA (13)

La concentración a aplicar es de 120 mg/l y la cantidad de la disolución de BABA a aplicar va en función del volumen de la maceta.

En el caso de *A.thaliana* el volumen de 50 cm³ por lo cual habrá que aplicar 5 ml de la disolución de BABA con la concentración indicada. Teniendo en cuenta esta información, por cada plantón se prepararán 5 ml de agua destilada y 0.6 mg de BABA, esto se mezclará en un agitador magnético. Posteriormente con una jeringuilla se inyectan 5 ml en el jiffy, por lo que la concentración que le llega a la planta es de 12 mg/l.

En el caso del calabacín el tamaño de las macetas es de 6x6x7, siendo el volumen de esta de 250 cm³ por lo cual habrá que aplicar 25 ml de la disolución de BABA con la concentración indicada. Teniendo en cuenta esta información, por cada plantón se prepararán 25 ml de agua destilada y 3 mg de BABA, esto se mezclará en un agitador magnético. Posteriormente con una jeringuilla se inyectan 25 ml en la tierra de la maceta, por lo que la concentración que le llega a la planta es de 12 mg/l.

eDNA

El DNA extracelular está ubicado fuera de las membranas celulares, a diferencia del DNA intracelular que está situado dentro de estas. El eDNA “se origina a partir del DNA intracelular por mecanismos de extrusión activos o pasivos o por lisis celular”.

Se ha decidido tratar con eDNA ya que se ha visto que tras su reconocimiento, el eDNA desencadena la generación de ROS, liberación de citocinas, cascadas de señalización MAPK y otras respuestas que se sabe están relacionadas con la inmunidad. Se ha observado que los efectos generados por el eDNA pueden depender de la distancia taxonómica entre la fuente y el receptor, por este motivo se ha decidido realizar la extracción de eDNA de la misma variedad que el receptor (12).

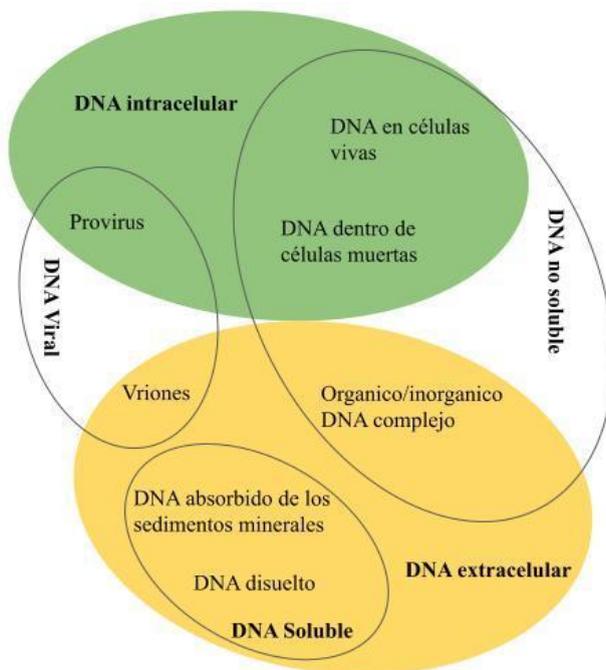


Figura 33. Representación DNA.

- *Protocolo de extracción:*

El protocolo de extracción es el mismo en ambos casos.

Primero hay que triturar las hojas en nitrógeno líquido hasta que queden en forma de polvo, una vez triturada la muestra se pesa y se añaden 4 ml la solución para la extracción de DNA por cada gramo de muestra, este mix se deja reposar a temperatura ambiente durante unos 30-45 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo se transfiere la muestra a tubos de 2 ml, introduciendo 1 ml en cada tubo (hay que cortar la punta de la punta de la pipeta ya que la muestra tiene una densidad elevada y si no se corta la pipeta no sería capaz de coger el

volumen), estos tubos se introducen en la centrifugadora previamente programada a 10°C y a 14000 rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante se recoge y se pone en unos nuevos tubos de 2 ml, estos se vuelven a centrifugar a 10°C y a 14000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se añade a un tubo de 15 ml en el que se añade el mismo volumen de isopropanol (B84) que de la muestra, este tubo se agita y se deja reposar durante 1 hora a -20°C.

Posteriormente se transfiere 1 ml del mix a tubos de 1,5 ml y se introducen a la centrifugadora a 10°C y a 13000 rpm durante 10 minutos, se quita el sobrenadante y se mantienen el pellet, a este pellet se le añaden 500 µl de EtoH al 70% para limpiar el pellet y se centrifuga a 10°C y a 13000 rpm durante 5 minutos y se quita el sobrenadante, este proceso se repite otra vez. Una vez limpio el pellet se deja secar al aire, sobre 2 horas, y una vez seco se le añade agua mili Q dependiendo de la concentración final buscada (50-250 µl).

Antes de tratar se procede a ajustar la solución, el tratamiento se realiza a una concentración de **150 ng/µl** por lo que hay que ajustar la concentración añadiendo agua mili Q. Este ajuste de la concentración se hace mediante una máquina NanoDrop, primero hay que introducir el blanco, que se trata de la misma agua mili Q que se utiliza para diluir la muestra, una vez hecho esto se procede a comprobar la pureza de la extracción, los resultados obtenidos se observan en la pantalla del ordenador asociado al NanoDrop como se ve en la **Figura 34**. Una vez conocida la concentración se añade agua mili Q hasta conseguir la concentración deseada.

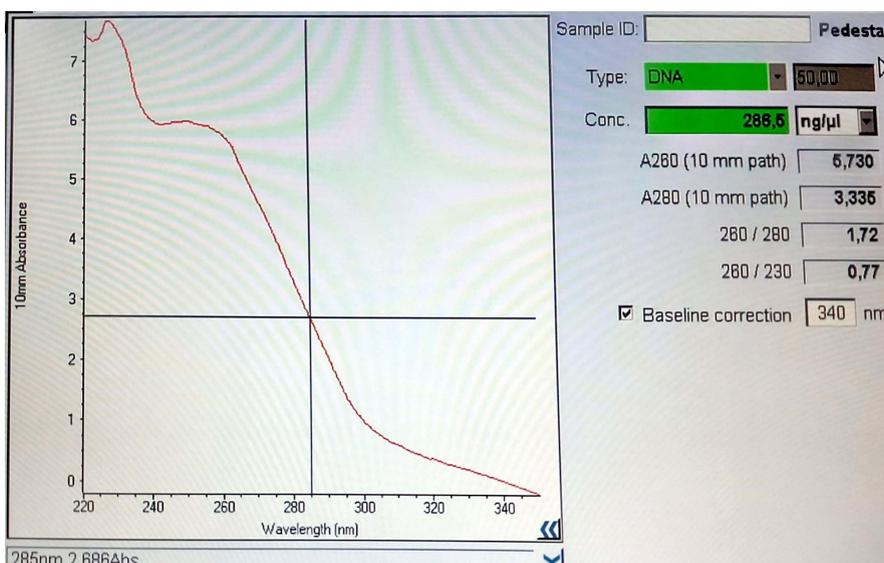


Figura 34. Resultados del NanoDrop.

I3CA

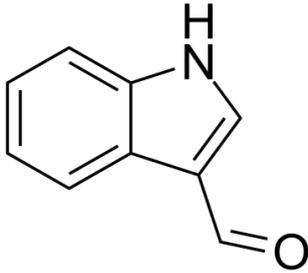


Figura 35. Estructura I3CA.

Como se ha comentado anteriormente en el apartado 1.7. Respuestas hormonales el I3CA es un derivado indólico que se ha visto una relación con la acumulación de callosa conjuntamente con el ABA ya que se vio que las plantas de *A. thaliana* mutantes deficientes en ABA al aplicarles I3CA no eran resistentes frente a *P. cucumerina* (8).

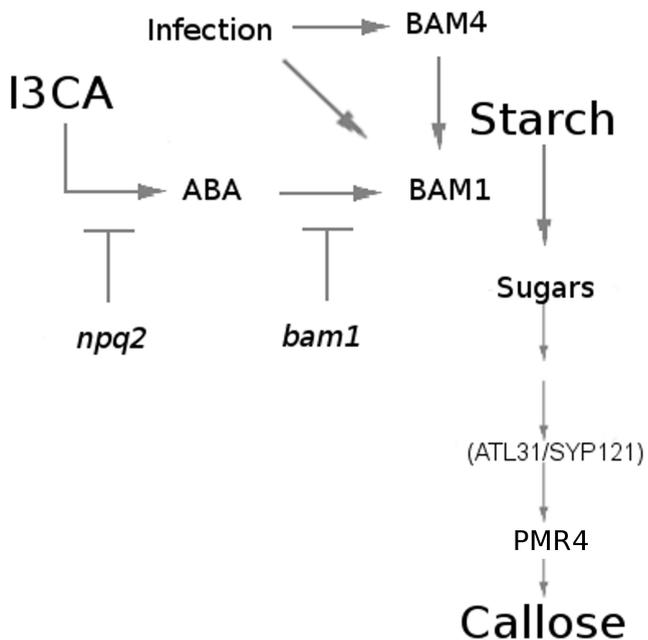


Figura 36. Modelo de priming callosa. (8)

La concentración a aplicar es de 24 mg/l y la cantidad de la disolución de I3CA a aplicar va en función del volumen de la maceta.

En el caso de *A. thaliana* el volumen de 50 cm³ por lo cual habrá que aplicar 5 ml de la disolución de I3CA con la concentración indicada. Teniendo en cuenta esta información, por cada plantón se prepararán 5 ml de agua destilada y 0.12 mg de I3CA, esto se mezclará en un agitador magnético. Posteriormente con una jeringuilla se inyectan 5 ml en la tierra en el jiffy.

En este caso el tamaño de las macetas del calabacín es de 6x6x7, siendo el volumen de esta de 250 cm³ por lo cual habrá que aplicar 25 ml de la disolución de I3CA con la concentración indicada. Teniendo en cuenta esta información, por cada plantón se prepararán 25 ml de agua destilada y 0.6 mg de I3CA, esto se mezclará en un agitador magnético al cual se le aplicará calor para facilitar la disolución.

El resumen de los tratamientos se presenta en las siguientes tablas:

Arabidopsis thaliana

Tratamiento	Concentración disolución	Dosis
BABA	120 mg/l	5 ml
DNA	150 ng/ μ l	1 spray/jiffy
<i>I₃CA</i>	24 mg/l	5 ml

Tabla 9. Concentraciones y dosis de los tratamientos *A.thaliana*.

Cucurbita pepo

Tratamiento	Concentración disolución	Dosis
BABA	120 mg/l	25 ml
DNA	150 ng/ μ l	1 spray/cotiledón
<i>I₃CA</i>	24 mg/l	25 ml

Tabla 10. Concentraciones y dosis de los tratamientos Calabacín.

2.2. Diseño del experimento

En el estudio se han realizado cuatro experimentos, los cuales se detallarán a continuación:

Experimento 1- *Arabidopsis thaliana*

En este experimento, se procede a comprobar si los tratamientos de BABA, eDNA y I3CA tienen efectividad en la generación de resistencia en el *A. thaliana* frente a *HPA*. Esta se organiza de la siguiente forma, se separan 4 bandejas, una por tratamiento (Control, BABA y eDNA), y en cada bandeja se introducen 12 jiffiss de *A. thaliana*, todos de la misma edad, como se muestra en la **Figura 37**.

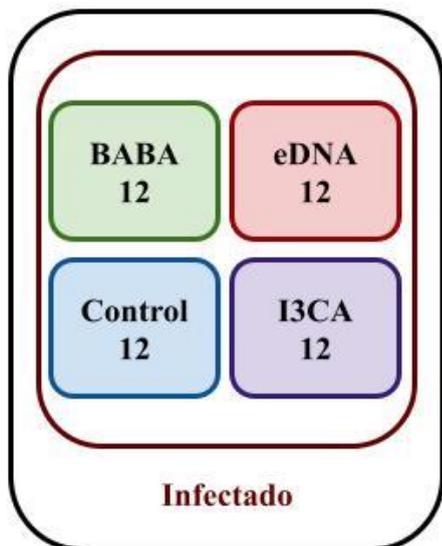


Figura 37. Esquema experimento 1.

Una vez tratadas las plantas, a las 24h se procede a infectar las con HPA en una concentración de 10^5 , a los seis días se tapan completamente las bandejas de las plantas infectadas para aumentar la humedad y forzar la esporulación. A las 24h de tapparlas completamente procede a realizar el conteo de esporas explicado en el punto 2.3. Fenotipos de resistencia, se realizará el conteo de espora de los cotiledones. Después del conteo de esporas se reservan las hojas en alcohol para conservar los tejidos hasta que se realice la tinción con trypan blue explicada en el punto 2.3. Fenotipos de resistencia, se realiza la tinción tanto de hojas como de los cotiledones.

Experimento 2- Calabacín 1

En este experimento, se procede a comprobar si los tratamientos de BABA y eDNA tienen efectividad en la generación de resistencia en el calabacín frente a *P. xanthii*.

Esta se organiza de la siguiente forma, se separan 3 bandejas, una por tratamiento (Control, BABA y eDNA), y en cada bandeja se introducen 4 plántones de calabacín, todos de la misma edad y de tamaños lo más iguales posible, como se muestra en la **Figura 38**.

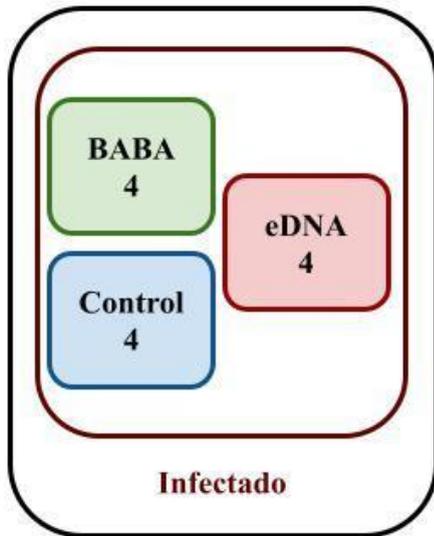


Figura 38. Esquema experimento 2.

Una vez separados los plantones por tratamiento, se procede a tratar, con las concentraciones especificadas en el siguiente punto (2.1. Tratamientos utilizados). Una vez transcurridas 48 h se procede a realizar la infección con una concentración de esporas de 10^5 , se aplica mediante la pulverización de esta disolución sobre la planta, en el caso de las plantas control se pulveriza agua del grifo, es importante dejar que las gotas que se quedan en las hojas se sequen antes de tapar las bandejas ya que si se tapa directamente ese exceso de agua puede matar al patógeno. Pasados 7 días en estas condiciones, se procede a tapar completamente las bandejas durante 48 h aumentando así la humedad lo cual favorece la esporulación del patógeno. Una vez transcurridas las 48 h se procede a realizar el conteo de esporas explicado en el punto 2.3. Fenotipos de resistencia, se realizará el conteo de espora de los cotiledones. Después del conteo de esporas se reservan las hojas en alcohol para conservar los tejidos hasta que se realice la tinción con trypan blue explicada en el punto 2.3. Fenotipos de resistencia, se realiza la tinción tanto de hojas como de los cotiledones.

Experimento 3- Calabacín 2

En este tercer experimento se procede a comprobar si los tratamientos de BABA y eDNA tienen efectividad en la generación de resistencia en el calabacín frente a *P. xanthii*, además se introduce un tratamiento nuevo I3CA para ver si tiene algún efecto en la inducción de resistencia.

Esta se organiza de la siguiente forma, se separan 4 bandejas, una por tratamiento (Control, BABA, eDNA e I3CA), y en cada bandeja se introducen 8 plantones de

calabacín, todos de la misma edad y de tamaños lo más iguales posible, como se muestra en la **Figura 39**.

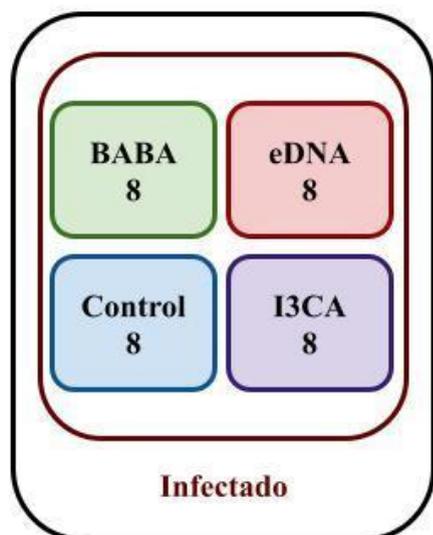


Figura 39. Esquema experimento 3

Una vez separados los plantones por tratamiento, se procede a tratar, con las concentraciones especificadas en el siguiente punto (2.1. Tratamientos utilizados). Una vez transcurridas 48 h se procede a realizar la infección con una concentración de esporas de 10^5 , se aplica mediante la pulverización de esta disolución sobre la planta, en el caso de las plantas control se pulveriza agua del grifo, es importante dejar que las gotas que se quedan en las hojas se sequen antes de tapar las bandejas ya que si se tapa directamente ese exceso de agua puede matar al patógeno. Pasados 7 días en estas condiciones, se procede a tapar completamente las bandejas durante 48 h aumentando así la humedad lo cual favorece la esporulación del patógeno. Una vez transcurridas las 48 h se procede a realizar el conteo de esporas explicado en el punto 2.3. Fenotipos de resistencia, se realizará el conteo de esporas de los cotiledones y de las hojas. Después del conteo de esporas se reservan las hojas en alcohol para conservar los tejidos hasta que se realice la tinción con trypan blue explicada en el punto 2.3. Fenotipos de resistencia, se realiza la tinción de los cotiledones.

Experimento 4- Calabacín extracción de hormonas

En este cuarto experimento se procede a comprobar mediante un análisis hormonal la efectividad de los tratamientos de BABA y eDNA en la generación de resistencia en el calabacín frente a *P. xanthii*.

En este último experimento lo que se busca es realizar un estudio hormonal de los tratamientos de BABA y de eDNA en calabacín, por lo que se realizará de la siguiente manera, para poder hacer las comparaciones es necesario tener muestras de cada tratamiento (los tratamientos están detallados en el apartado 2.1. Tratamientos utilizados) sin infectar y infectado, por lo que se organizará en 6 bandejas, con 4 plántones de calabacín cada una, todos de la misma edad y de tamaños lo más iguales posible, 2 bandejas serán tratadas con BABA, una de ellas se infecta y la otra no, otras 2 tratadas con eDNA, una de ellas infectada y la otra no y finalmente las 2 restantes serán las control, que igual que las otras, una de las bandejas se infecta y la otra no. Con esta organización se tiene un doble negativo (control sin infectar) y todas las posibles combinaciones para poder realizar las comparaciones necesarias, como se muestra en la **Figura 40**.

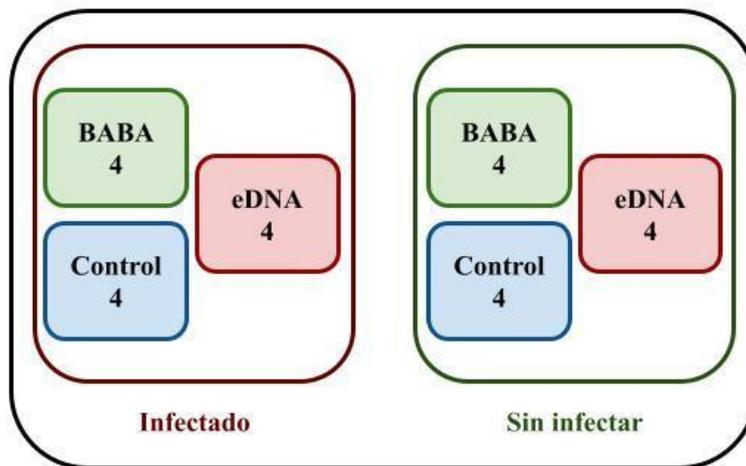


Figura 40. Esquema experimento 4.

En este caso a diferencia de las dos rondas anteriores no será necesario esperar tanto tiempo ya que en cuanto se muestre algún indicio de síntomas, pero apenas desarrollado, en las plantas infectadas se realizará el muestreo explicado en el apartado 2.4. Análisis hormonal.

2.3. Fenotipos de resistencia

2.3.1. Conteo de esporas

Para la realización del conteo de esporas se utiliza la cámara cuenta glóbulos, tubos falcon de 50 ml, microscopio, una pipeta y agua del grifo (al utilizar un agua con mayor concentración de sales se reduce la diferencia de la concentración del interior con la del exterior de la spora, obteniendo más tiempo para contar las esporas)

En el caso del calabacín, se contarán las esporas presentes en las dos gradillas conformando un total de 288 cuadrados ya que la esporulación de *P.xanthii* es reducida, y en el caso de *A.thaliana* se contarán las esporas presentes en 12 de los cuadrados.

Primero se procede a rotular y pesar los tubos falcon vacíos, anotando su peso, una vez realizado esto se introducen en ellos el material vegetal y se vuelven a pesar para saber el peso del material vegetal. Una vez pesado se introducen, 15 ml en el caso del calabacín y 5 ml en el caso de *A.thaliana*, de agua del grifo en cada falcón y se sacude bien para que las esporas se suelten de las hojas. Con la pipeta se ponen 10 μ l en el borde del cubre de cada una de las gradillas ya que el líquido se introduce por capilaridad. Se cuentan el número de esporas como se ha indicado anteriormente, con esto, sabiendo las dimensiones de esta gradilla, la cantidad de agua empleada y el peso de cada muestra obtenemos las esporas que hay en cada mg de planta para poder hacer las correspondientes comparaciones. En el calabacín el cálculo de esporas / mg de planta se realiza de la siguiente manera, el número de esporas contadas en ambas gradillas dividido por 288, para obtener las esporas que hay por cuadrado, este valor se multiplica por 15000 (Vol de agua añadida) y se divide por 0,00025 (volumen del cuadrado), con esto obtenemos las esporas partido ml y esto se divide por el peso del material vegetal. En el caso de *A.thaliana* el cálculo de esporas / mg de planta se realiza de la siguiente manera, el número de esporas contadas en los cuadrados dividido por 12, para obtener las esporas que hay por cuadrado, este valor se multiplica por 5000 (Vol de agua añadida) y se divide por 0,00025 (volumen del cuadrado), con esto obtenemos las esporas partido ml y esto se divide por el peso del material vegetal para poder comparar correctamente unas con otras.

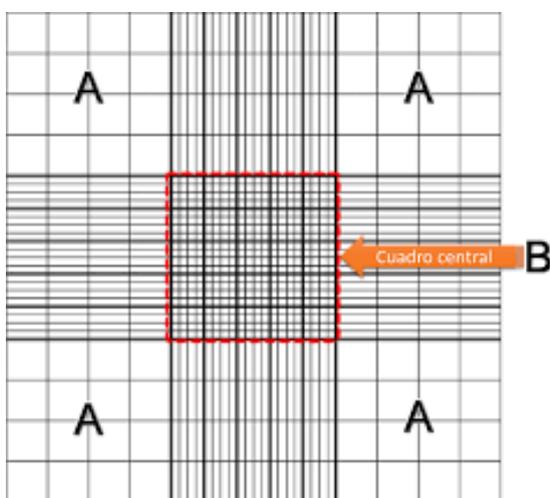


Figura 41. Gradilla cámara cuentaglóbulos

2.3.2. Tinción

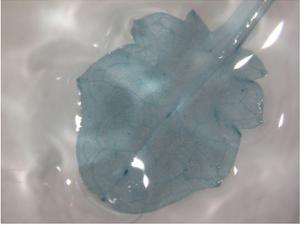
Preparación disoluciones:

- *Hidrato de cloral* (50 g de Hidrato de cloral por cada 20 ml de agua destilada). Los botes de hidrato de cloral son de 1 kg por lo que se pone un vaso de precipitado con 400 ml de agua destilada y se va añadiendo el hidrato de cloral poco a poco mientras se va removiendo la mezcla en el agitador magnético ya que cuesta bastante que se disuelva.
- *Trypan blue* (2 partes de ethanol 97% por 1 parte de lactophenol). La disolución base de lactophenol, se prepara mediante 10 g de fenol, 10 ml de glicerol, 10 ml de ácido láctico, 10 ml de agua destilada y 20 mg de trypan blue. Hay que preparar la cantidad que se vaya a usar, dependiendo de la cantidad deseada se multiplican las cantidades base.

Una vez se tienen las disoluciones el proceso de tinción consiste en lo siguiente, se retira el alcohol en el que están las hojas y estas se cubren con la disolución de trypan blue, mientras se van cubriendo las hojas se pone a calentar el agua hasta que llegue a ebullición. Una vez el agua esté en ebullición se introducen las hojas durante 1 minuto y se saca a temperatura ambiente durante otro minuto, pasado este tiempo se sumerge otra vez durante 30 segundos y se deja a temperatura ambiente en el caso de *A.thaliana* 2,5 h y en el caso del calabacín durante 24 h. Transcurrido este tiempo se retira la disolución de trypan blue y se rellena con la disolución de hidrato de cloral.

Posteriormente se extienden las hojas teñidas en una placa petri y se visualizan en la lupa, en *A.thaliana* se visualizarán 2 hojas de cada muestra, en el caso de las hojas de calabacín al tratarse de hojas grandes se realizan 10 fotos de cada una, centrándose en las zonas más infectadas.

Para la valoración del ratio de infección se establece un ratio de 0 a 4, tratándose 0 las que presenten un menor grado de infección y 4 las que mayor grado de infección, teniendo esta escala como base a partir de las cuales se otorgará los diferentes valores a las demás, en la **Tabla 11** se muestra un ejemplo de cada valor de la escala en el caso de arabis y en la **Tabla 12** se muestra en el caso de calabacín.

Valores	Ejemplo
0	
1	
2	

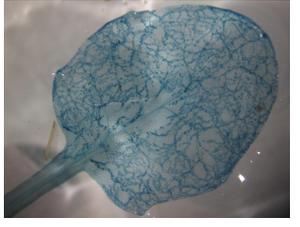
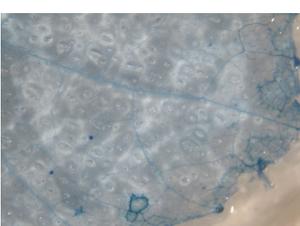
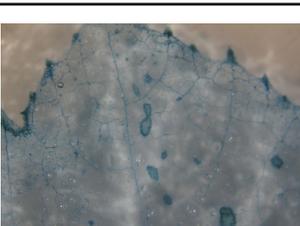
Valores	Ejemplo
3	
4	

Tabla 11. Valores guía para la valoración de la tinción *A.thaliana*.

Valores	Ejemplo
0	
1	
2	

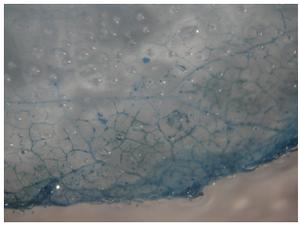
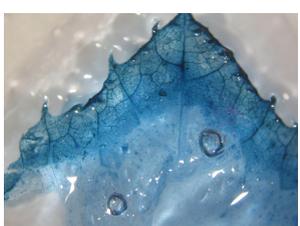
Valores	Ejemplo
3	
4	

Tabla 12. Valores guía para la valoración de la tinción Calabacín.

2.4. Análisis hormonal

Para la realización del análisis hormonal, como se ha comentado en el apartado del diseño del experimento, únicamente se hace en el experimento 4 con calabacín y

- El *muestreo* del material se realiza cuando se empiezan a visualizar algunos síntomas, pero sin dejar que se desarrollen mucho. El procedimiento es el siguiente, en tubos falcon de 50 ml rotulados se introduce el material vegetal y directamente se introducen en nitrógeno líquido, con una varita se machaca el material vegetal congelado con el nitrógeno hasta que quede en forma de polvo y ese polvo se introduce en unos tubos de 2 ml anteriormente rotulados como se muestra en la **Figura 42** Estos tubos se guardan a -80°C hasta que se realice la liofilización.

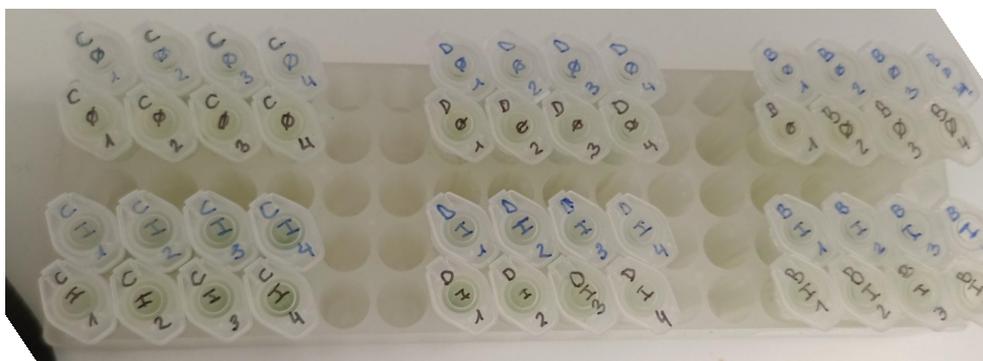


Figura 42. Rotulación de los tubos de 2ml.

- Para realizar la *liofilización* de las muestras se procede a sacar las muestras del ultracongelador e introducirlas en nitrógeno líquido para evitar que se descongelen. Con mucho cuidado de que no se descongelen, se abren los tubos y se pone en la parte en la que se pone la tapa, un papel albal doblado 4 veces al que se le realizan unos agujeros, estos tubos se ponen en una gradilla y en el nitrógeno hasta que se lleven a la máquina de liofilización. Una vez haya acabado la máquina se guardan las muestras, estas pueden estar a temperatura ambiente.
- El protocolo de la *extracción hormonal* es el siguiente, primero se pesan 30 mg del polvo liofilizado de las muestras y se introducen en otro tubo de 2 ml rotulado, este polvo tiene que rehidratarse mediante 1 ml de una disolución $\text{MeOH} + \text{HCOOH}$ 0,01% y $\text{H}_2\text{O} + \text{HCOOH}$ 0.01% al 30% a la que se le añaden 10μ de SI a 10 ppm y 4 perlas de cristal, esto se deja durante 30 minutos en el

hielo y pasado ese tiempo se introduce en el shaker durante 30 segundos para que se mezcle bien. Posteriormente se centrifuga durante 15 minutos a 15000 rpm a una temperatura de 4°C, una vez terminado el proceso de centrifugación se extrae el sobrenadante en otro tubo de 2 ml igualmente rotulado y se reserva en el congelador hasta que se proceda a realizar dicha extracción. Cuando se va a realizar la cromatografía se sacan las muestras del congelador y cuando están descongeladas se centrifuga durante 15 mins a 15000 rpm y a una temperatura de 4° C, mientras las muestras están en la centrifugadora se procede a rotular los viales de cromatografía. La muestra tiene que ser diluida 3 veces, por lo que se introducirá en cada vial 50 µl de la muestra y 100 µl de metanol (MeOH HCOOH 0.01%) y agua (H_2O + HCOOH 0.01%) al 30%. Además de las muestras, en el cromatógrafo hay que añadir la curva de calibrado, en este caso se introducen 150 µl 0.01-0.1-0.5-1-5-10-25 ppb.

- *Manejo cromatógrafo*, este funciona mediante dos fases móviles (A2, fase acuosa (H_2O mQ+0.01%HCOOH) y B2, fase orgánica (CH_3OH), las botellas de estas tienen que estar llenas, por lo que hay que cambiarlas cuando se vaya a usar. La columna a emplear está indicada como Q-TOF HORMONES, y hay que colocarla en la máquina teniendo en cuenta el sentido de esta, marcado con una flecha. Una vez preparados los componentes se procede a indicar el proyecto que contenga las condiciones a estudiar ya establecidas, teniendo cuidado de no sobrescribirlo. Mientras se equilibra la columna se procede a rellenar la gradilla en el sentido que se muestra en la **Figura 43**. A continuación se da nombre a las muestras, se introduce la gradilla y se empieza el análisis.

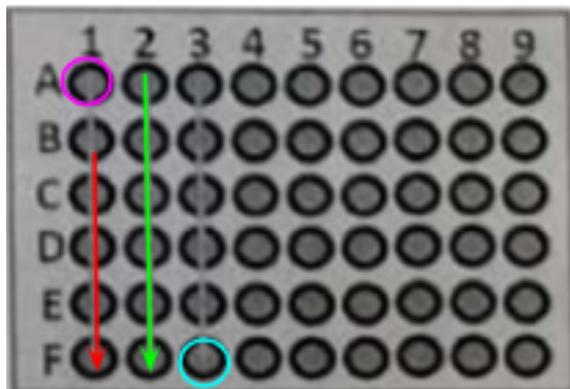


Figura 43. Colocación viales cromatógrafo, primero se pone el blanco (morado), después se pone la curva (flecha roja), seguido se introducen las muestras (flecha verde) y por último el lavado.

OBJETIVOS

3. Objetivos del trabajo

La inducción de resistencia en plantas ya no es un tema nuevo, se ha observado que diversas sustancias inducen a las plantas en un estado de priming en el cual estas plantas son capaces de reaccionar frente el ataque de un patógeno de una forma más veloz y más efectiva. Que las plantas sean más resistentes a los ataques de los patógenos es una de las principales preocupaciones en el mundo de investigación relacionada con las especies vegetales ya que de esta forma se eliminaría el uso de tratamientos químicos, por ende una reducción en el coste de producción y una mayor efectividad en los cultivos ya que se reducirían las pérdidas causada por estos patógenos.

Por estos motivos los objetivos de este estudio son los siguientes:

1. Determinar la efectividad en la generación de resistencia inducida mediante BABA y eDNA en *Cucurbita pepo* frente a *P.xanthii*

- Investigar la reducción de la esporulación en las plantas tratadas con los diferentes tratamientos.
- Investigar la reducción en la infección generada por *P. xanthii* en los diversos tratamientos.
- Ver como afectan los diversos tratamientos hormonalmente a las plantas.

2. Determinar la efectividad en la generación de resistencia inducida mediante BABA, I3CA y eDNA en *Arabidopsis thaliana* frente a HPA

- Investigar la reducción de la esporulación en las plantas tratadas con los diferentes tratamientos.
- Investigar la reducción en la infección generada por HPA en los diversos tratamientos.

RESULTADOS

4. Resultados

A continuación se procede a presentar los resultados de las diversas pruebas realizadas. En todas las gráficas se ha hecho un intervalo de confianza y un t-test mediante el excel, para ver si los resultados son significativamente diferentes, resultando que si el valor es menor a 0,05 (marcado en negrita) son significativamente distintas, en el caso de que sea superior no se puede afirmar que sean distintos.

4.1. Experimento 1- *Arabidopsis thaliana*

Conteo de esporas

Como se puede observar en la **Gráfica 1**, los resultados obtenidos del conteo de esporas son bastante llamativos. Una vez analizados los datos podemos observar los siguientes resultados del conteo de esporas:

En el caso de las plantas tratadas con BABA, los resultados obtenidos son muy llamativos, en comparación con las plantas Control se observa una reducción del 98% en la esporulación y en comparación con las plantas tratadas con eDNA e I3CA se observa una reducción en la esporulación de un 97% siendo estos resultados significativamente diferentes. Por lo que se puede decir que se observa una reducción muy llamativa en la esporulación en el caso de las plantas tratadas con BABA.

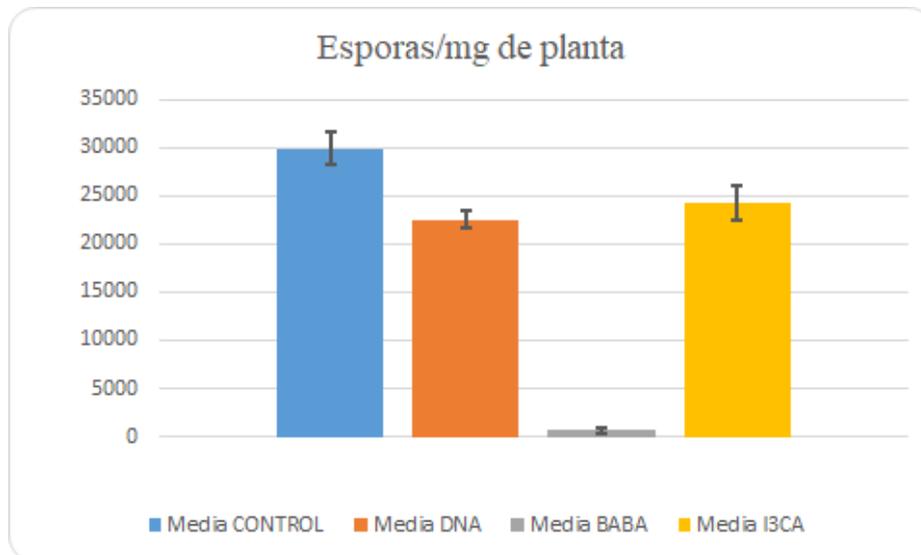
En el caso de las plantas tratadas con I3CA, comparadas con las tratadas con eDNA los resultados no son significativamente distintos al igual que con los resultados Control, observándose una variación de un 7% más de esporulación que en las plantas tratadas con eDNA y un 19% menos que en las plantas Control.

En el caso de los resultados en el conteo de las plantas tratadas con eDNA en comparación con las plantas Control son significativamente diferentes y en eDNA la esporulación es un 25% menor que en las plantas Control.

t-test Control-eDNA	0.023160447
t-test Control-BABA	4.81221E-07
t-test Control-I3CA	0.105046082
t-test eDNA-BABA	5.10835E-06

t-test I3CA-BABA	4.15577E-06
t-test I3CA-eDNA	0.307920296

Tabla 13. Tabla resultados t-test conteo esporas Experimento 1- *Arabidopsis thaliana*.



Gráfica 1. Resultados del conteo de esporas en *A.thaliana*. $N_c = 12, N_D = 12, N_B = 12, N_I = 12$.

Tinción

En la **Gráfica 2** se muestran los resultados obtenidos de las tinciones y en la **Figura 44** se puede observar unos ejemplos de los resultados obtenidos en las tinciones. De los datos obtenidos de las tinciones, tras el pertinente análisis se observan los siguientes resultados, siendo todos los resultados significativamente distintos:

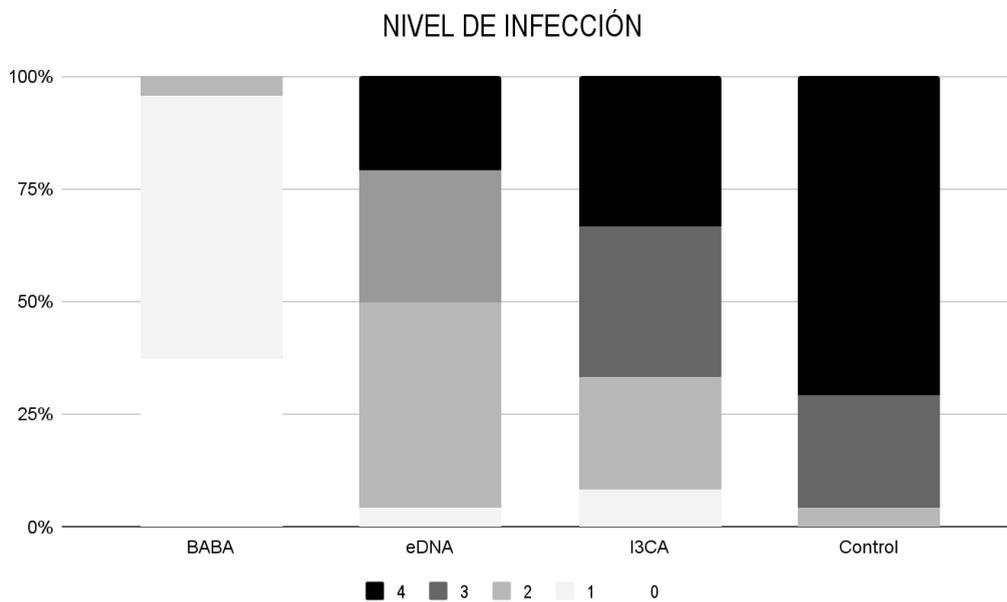
En lo relativo a las tinciones de las plantas tratadas con BABA, en comparación con las plantas Control se observa una disminución de un 85% en la infección y en comparación con las plantas tratadas con eDNA e I3CA se observa una reducción de la infección de un 26% en el frente a eDNA y un 20% en el frente a I3CA.

En el caso de las plantas tratadas con I3CA, en comparación con las tratadas con eDNA se observa una variación de un 7% más de infección que en las plantas tratadas con eDNA y un 20% menos que en las plantas Control.

En el caso de los resultados en el las tinciones de las plantas tratadas con eDNA en comparación con las plantas Control se observa una disminución de un 26% del porcentaje de infección en las plantas tratadas con eDNA.

t-test Control-DNA	1.16594E-05
t-test Control-BABA	3.7889E-23
t-test Control-I3CA	2.70944E-06
t-test DNA-BABA	4.37092E-13
t-test I3CA-BABA	4.23616E-12
t-test I3CA-DNA	0.00012338

Tabla 14. Tabla resultados t-test tinción Experimento 1- *Arabidopsis thaliana*.



Gráfica 2. Resultados de la tinción en *A. thaliana*. $N_c = 24, N_D = 24, N_B = 24, N_I = 24$.

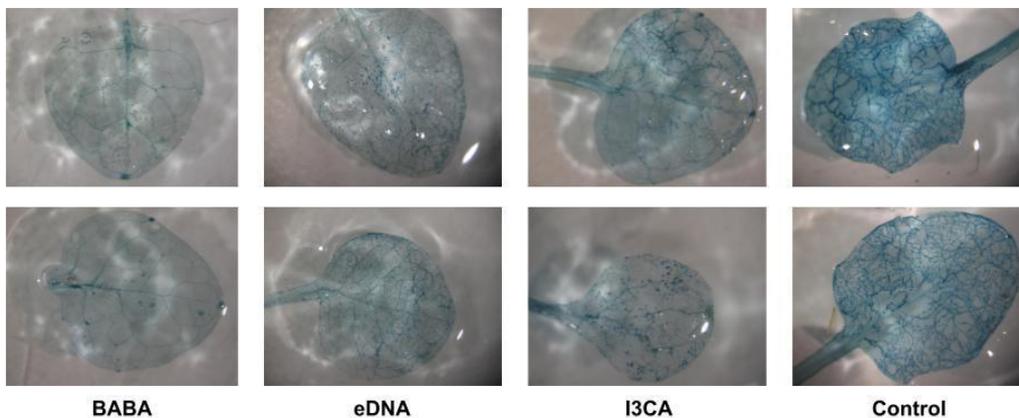


Figura 44. Imágenes tinciones Experimento 1- *Arabidopsis thaliana* separadas por tratamiento.

4.2. Experimento 2- Calabacín 1

Conteo de esporas

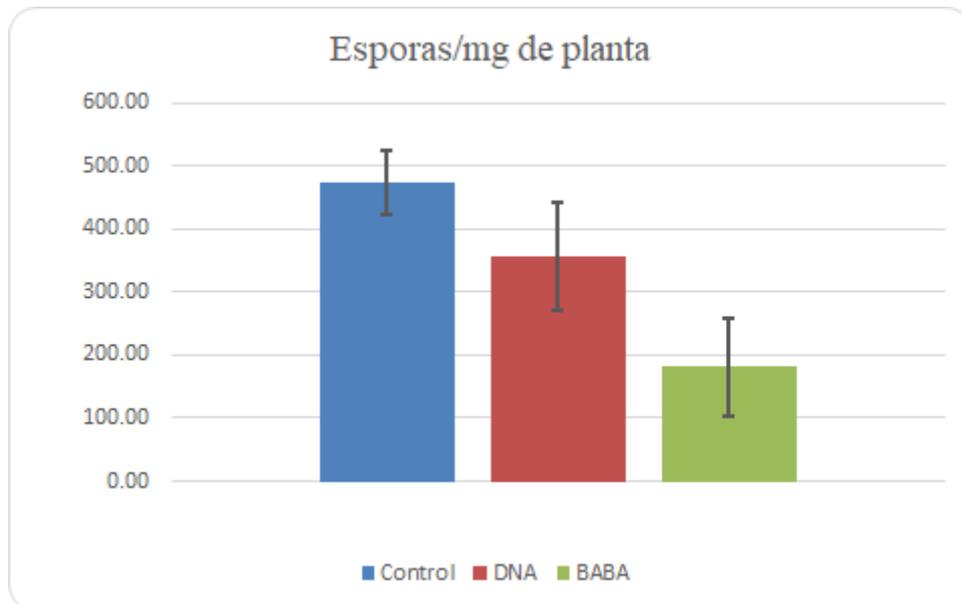
En la **Gráfica 3**, se observan los resultados del conteo de esporas realizado, tras los pertinentes análisis.

En el caso de las plantas tratadas con BABA se observa una disminución significativa de la esporulación en comparación con las plantas Control, esta disminución es de alrededor del 60%. Además en comparación con las plantas tratadas con eDNA, las diferencias no son estadísticamente significativas, pero se aprecia una tendencia de disminución de un 49% de la esporulación en las plantas tratadas con BABA.

En las plantas tratadas con eDNA comparadas con las Control, las diferencias no son estadísticamente significativas, pero la tendencia observada es de una disminución de un 25% en la esporulación de las plantas tratadas con eDNA.

t-test Control-DNA	0.15217
t-test Control-BABA	0.01297
t-test DNA-BABA	0.09232

Tabla 15. Tabla resultados t-test conteo esporas Experimento 2- Calabacín 1.



Gráfica 3. Conteo de esporas Experimento 2- Calabacín 1. $N_c = 8, N_D = 8, N_B = 8$.

Tinción

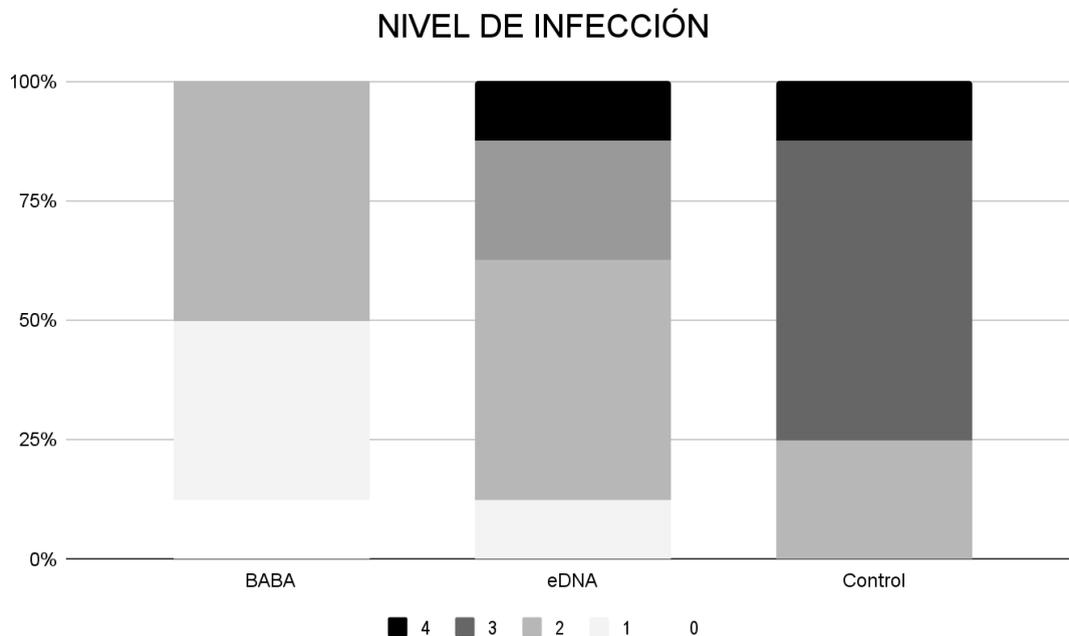
Tras la realización de las tinciones se han obtenido los resultados representados en la **Gráfica 4**. también se ha presentado en la **figura 45** una muestra de las imágenes obtenidas de las tinciones realizadas.

En lo relativo a las plantas tratadas con BABA, se pueden observar diferencias significativas en relación con las plantas Control y las tratadas con eDNA, observándose una disminución del ratio de la infección de un 50% y un 42% respectivamente.

En el caso de las plantas tratadas con eDNA frente a las Control, las diferencias no son estadísticamente distintas, pero se aprecia una tendencia descendiente en el ratio de infección de un 17% en el caso de las plantas tratadas con eDNA.

t-test Control-DNA	0,1144637421
t-test Control-BABA	0,0003698360401
t-test DNA-BABA	0,0158686539

Tabla 16. Tabla resultados t-test conteo esporas Experimento 2- Calabacín 1.



Gráfica 4. Tinción Experimento 2- Calabacín 1. $N_c = 8, N_D = 8, N_B = 8$.

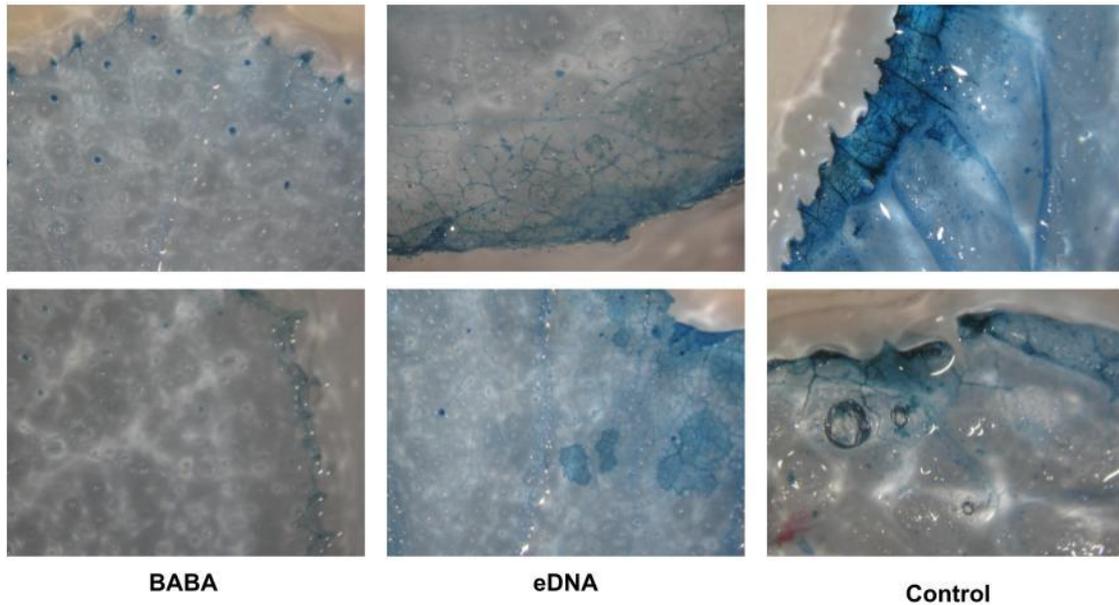


Figura 45. Imágenes tinciones Experimento 2- Calabacín 1 separadas por tratamiento.

4.3. Experimento 3- Calabacín 2

Conteo de esporas

Los resultados del conteo de esporas de este experimento se muestran en la **Gráfica 5.** tras el análisis estadístico.

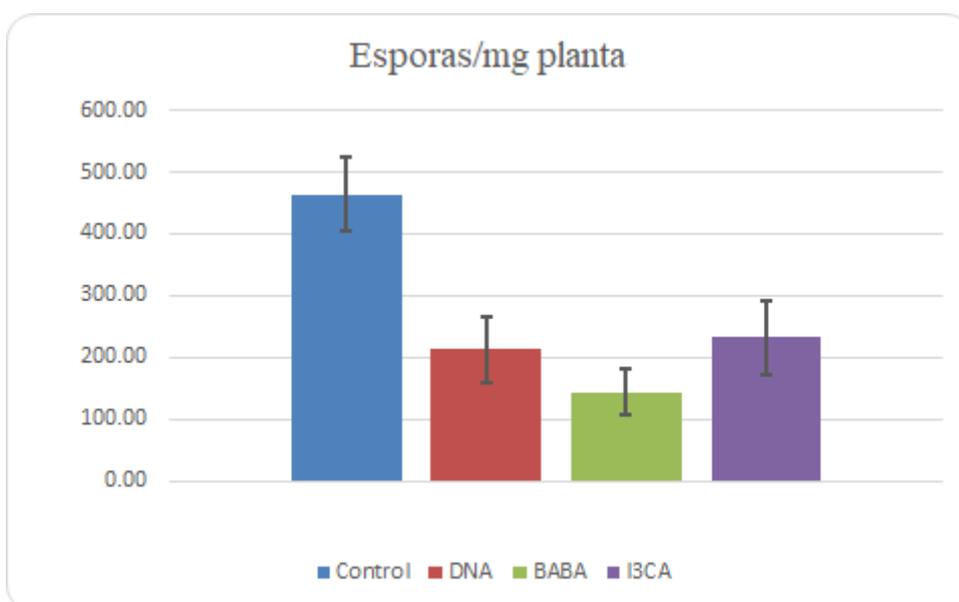
Los resultados del conteo de esporas en el caso de las plantas tratadas con BABA, son los siguientes, en comparación con las plantas Control, se observan diferencias significativas obteniendo una disminución de casi un 70%. En comparación con las tratadas con I3CA y eDNA, las diferencias en la esporulación de BABA, no son significativas, pero se aprecia una tendencia descendente en la esporulación de un 38% y 32% respectivamente.

En el caso de las plantas tratadas con I3CA, se observa un descenso de un 50% en la esporulación en comparación con las plantas Control, siendo la diferencia entre estas significativa. En comparación con las plantas tratadas con eDNA no se aprecian diferencias significativas, viéndose una tendencia ascendente de un 7% en la esporulación de las plantas tratadas con eDNA respecto a las tratadas con I3CA.

Por último en el caso de las plantas tratadas con eDNA en comparación con las plantas Control, las diferencias en el conteo de esporas son significativamente distintas, pudiéndose observar un descenso del 54% en las plantas tratadas con eDNA.

t-test Control-DNA	0.02459474
t-test Control-BABA	0.004517356
t-test Control-I3CA	0.038570931
t-test DNA-BABA	0.243575397
t-test I3CA-BABA	0.201886906
t-test I3CA-DNA	0.434345867

Tabla 17. Tabla resultados t-test conteo esporas Experimento 3- Calabacín 2.



Gráfica 5. Conteo de esporas Experimento 3- Calabacín 2. $N_c = 8$, $N_D = 8, N_B = 8, N_I = 8$.

Tinción

En la **Gráfica 6** se muestran los resultados obtenidos de las tinciones realizadas y en la **Figura 46.** se muestran unos ejemplos de los resultados obtenidos en las mismas tinciones. De los datos obtenidos, tras el pertinente análisis se observan los siguientes resultados, siendo todos los resultados significativamente distintos:

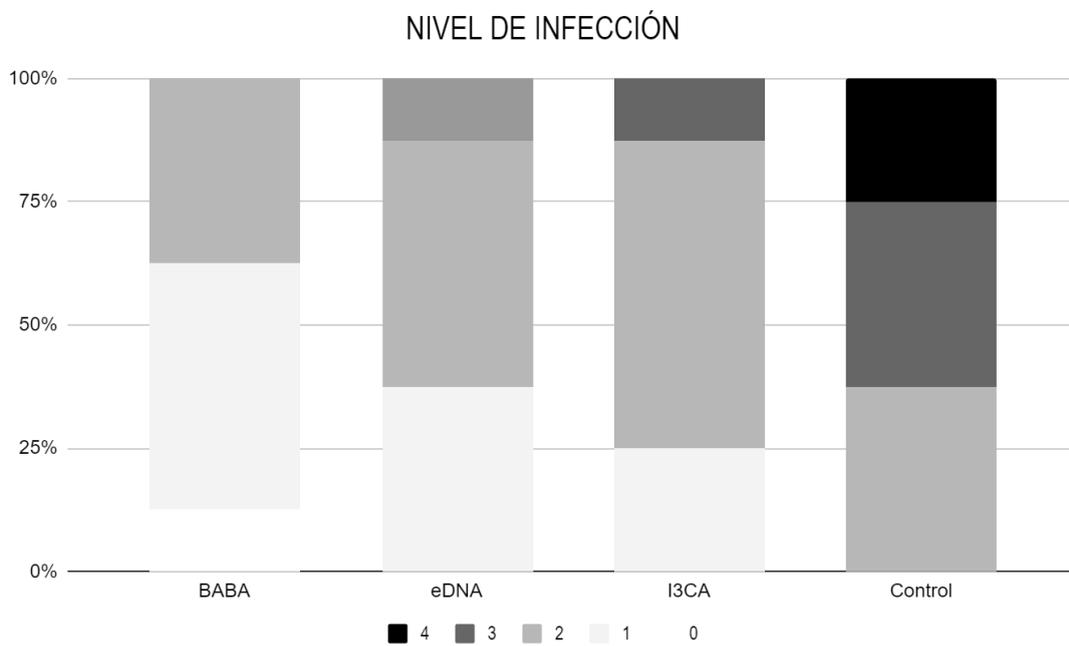
En lo referente a las tinciones de las plantas tratadas con BABA se observa una reducción del 57% en comparación con las plantas Control, una reducción del 29% en comparación con las plantas tratadas con eDNA y de un 33% respecto a las plantas tratadas con I3CA. Siendo las diferencias entre todos los casos significativamente distintas.

En el caso de las tinciones de las plantas tratadas con I3CA se observan diferencias significativas con las Control y las tratadas con eDNA, viéndose una reducción de un 35% respecto a las plantas Control y una reducción del 7% respecto a las tratadas con eDNA.

Por último en el caso de las plantas tratadas con eDNA en comparación con las plantas Control se observa una reducción significativa de alrededor del 40%.

t-test Control-DNA	1.16594E-05
t-test Control-BABA	3.7889E-23
t-test Control-I3CA	2.70944E-06
t-test DNA-BABA	4.37092E-13
t-test I3CA-BABA	4.23616E-12
t-test I3CA-DNA	0.00012338

Tabla 18. Tabla resultados t-test tinción Experimento 3- Calabacín 2.



Gráfica 6. Tinción Experimento 3- Calabacín 2. $N_c = 8, N_D = 8, N_B = 8, N_I = 8$.

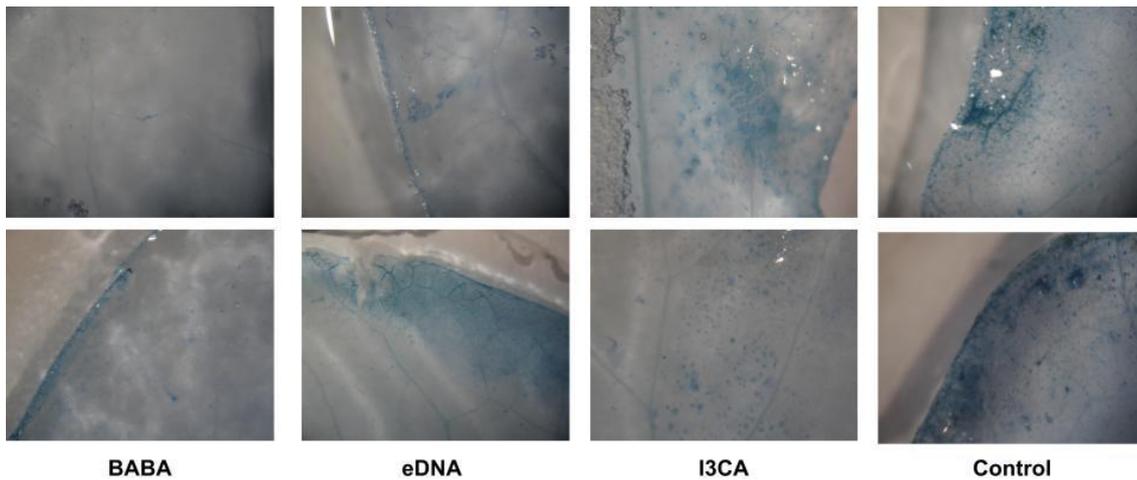


Figura 46. Imágenes tinciones Experimento 3- Calabacín 2 separadas por tratamiento.

4.4. Experimento 4- Calabacín extracción de hormonas

4.4.1. ABA

En lo relativo al contenido en ABA en las plantas estudiadas se muestran los resultados en la **Gráfica 7**.

Dentro de cada tratamiento se puede observar que en el caso de las plantas Control, no se aprecia una diferencia en el contenido hormonal de ABA entre las plantas tratadas y las no tratadas viéndose una disminución de un 7% en el caso de las plantas infectadas.

En el caso de las plantas tratadas con BABA se observa una diferencia significativa entre las plantas infectadas y las no infectadas, apreciándose una disminución de un 73% en el caso de las plantas infectadas. Por último en el caso de las plantas tratadas con eDNA se observa una disminución significativa del 66% en el caso de las plantas infectadas.

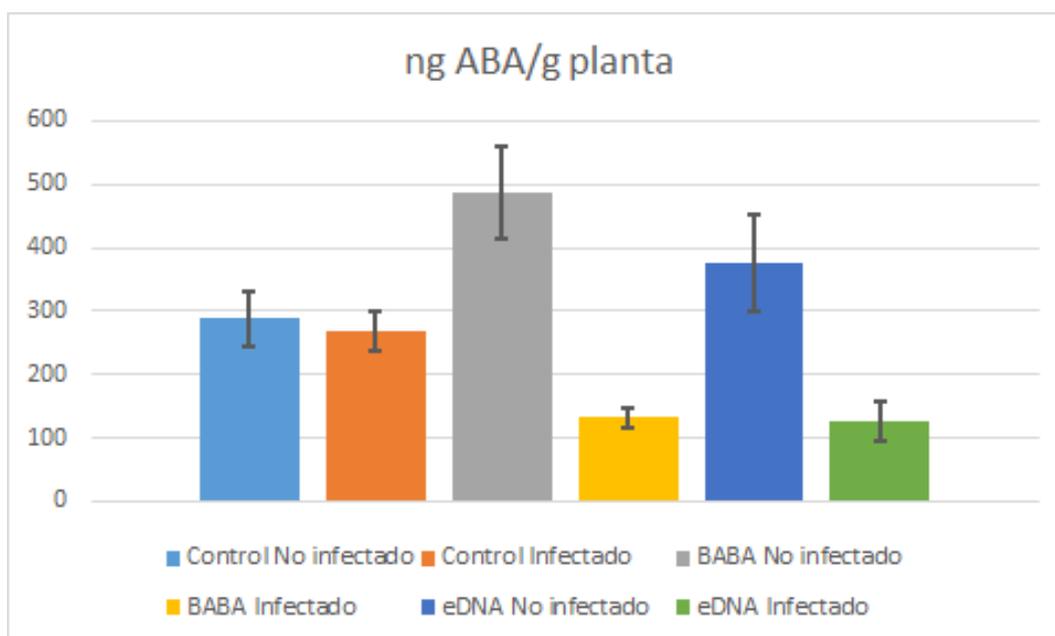
Entre los tratamientos, se puede observar que en las plantas no infectadas, las diferencias observadas entre los tratamientos únicamente son estadísticamente significativas en el caso de las plantas Control y las tratadas con BABA entre las cuales se aprecia un aumento de un 41% en el contenido de ABA. También se observa una tendencia ascendente de un 23% en el contenido de ABA en las plantas tratadas con eDNA frente a las plantas Control. La tendencia observada entre las plantas tratadas con eDNA y las tratadas con BABA es de un descenso del 23% en las plantas tratadas con eDNA frente a las de BABA.

En el caso de las plantas infectadas, se observa un descenso significativo en lo relativo a las plantas Control frente a las plantas tratadas con BABA y con eDNA, siendo estos

descensos de un 51% y un 53% respectivamente. En el caso de las plantas tratadas con baba en comparación con las plantas tratadas con eDNA, las diferencias no son significativas, observándose una disminución de apenas un 3% en el caso de las tratadas con eDNA frente a las tratadas con BABA.

Control Inf-Control no Inf	0,367305976
BABA Inf-BABA no Inf	0,008055951
eDNA Inf-eDNA no Inf	0,021319659
Control Inf-BABA Inf	0,006909401
Control Inf-eDNA Inf	0,009340105
BABA Inf-eDNA Inf	0,454258434
Control no Inf-BABA no Inf	0,036985314
Control no Inf-eDNA no Inf	0,190356974
BABA no Inf-eDNA no Inf	0,170747524

Tabla 19. Tabla resultados t-test ABA.



Gráfica 7. Contenido hormonal en ABA. $N_{cni} = 4, N_{ci} = 4, N_{Dni} = 4, N_{Di} = 4, N_{Bni} = 4, N_{Bi} = 4$.

4.4.2. SA

En relación al contenido en SA en las plantas estudiadas se muestran los resultados en la **Gráfica 8**.

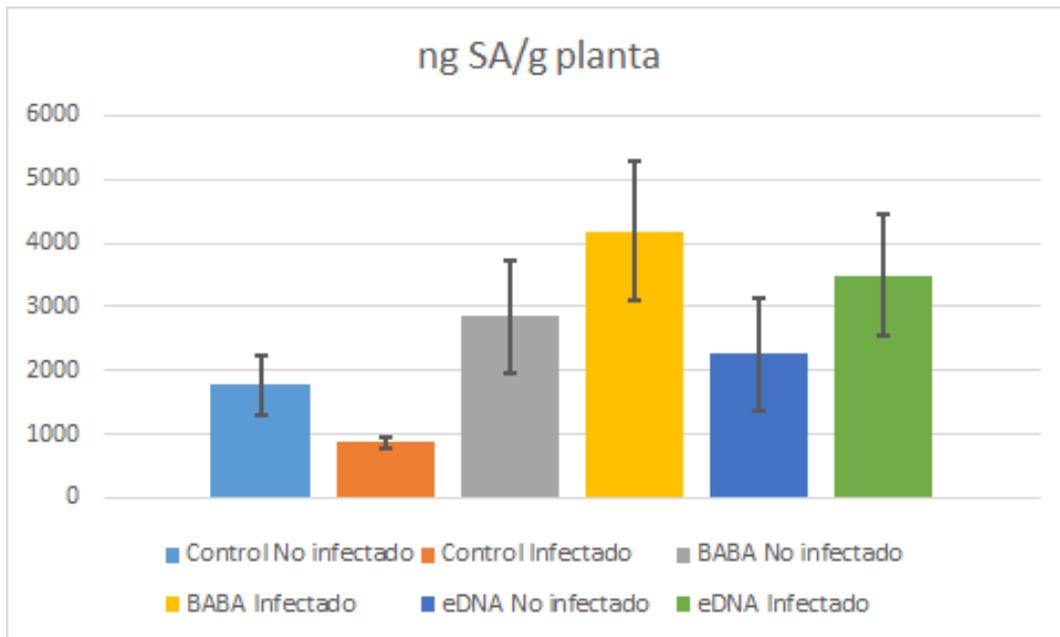
Dentro de cada tratamiento se puede observar que en las plantas Control, las diferencias entre las plantas infectadas y las no infectadas no son significativamente distintas, pero se observa una tendencia decreciente del contenido hormonal en SA en torno al 50% en el caso de las plantas infectadas. En lo referente a las plantas tratadas con BABA, las diferencias no son significativas, pero la tendencia es de un aumento del 32% en el caso de las plantas infectadas. Por último en las plantas tratadas con eDNA las diferencias no son significativas pero al igual que en las plantas tratadas con BABA se observa una tendencia ascendente del 35% en el caso de las plantas infectadas, frente a las no infectadas.

Entre tratamientos, se puede observar en el caso de las plantas no infectadas, que las diferencias no son significativas, pero sí se aprecian las siguientes tendencias, en el caso de las plantas Control se observa una tendencia descendente tanto frente a las plantas tratadas con BABA y eDNA de un 38% y un 21% respectivamente. En las plantas tratadas con eDNA se observa una tendencia descendente de un 21% en el contenido de SA frente a las plantas tratadas con BABA.

En el caso de las plantas infectadas, se observan diferencias significativas entre las plantas Control y las plantas tratadas con BABA y eDNA, viéndose unos descensos del 57% y el 49% respectivamente. Las diferencias entre las plantas tratadas con eDNA y con BABA no son significativas, pero la tendencia es de una disminución del 17%.

Control Inf-Control no Inf	0,074552745
BABA Inf-BABA no Inf	0,195122346
eDNA Inf-eDNA no Inf	0,195369135
Control Inf-BABA Inf	0,029392403
Control Inf-eDNA Inf	0,036575769
BABA Inf-eDNA Inf	0,328425119
Control no Inf-BABA no Inf	0,174040276
Control no Inf-eDNA no Inf	0,329944347
BABA no Inf-eDNA no Inf	0,331604337

Tabla 20. Tabla resultados t-test SA.



Gráfica 8. Contenido hormonal en SA. $N_{cni} = 4, N_{ci} = 4, N_{Dni} = 4, N_{Di} = 4, N_{Bni} = 4, N_{Bi} = 4$

4.4.3. JA

En lo referente al contenido en JA en las plantas estudiadas se muestran los resultados en la **Gráfica 9**.

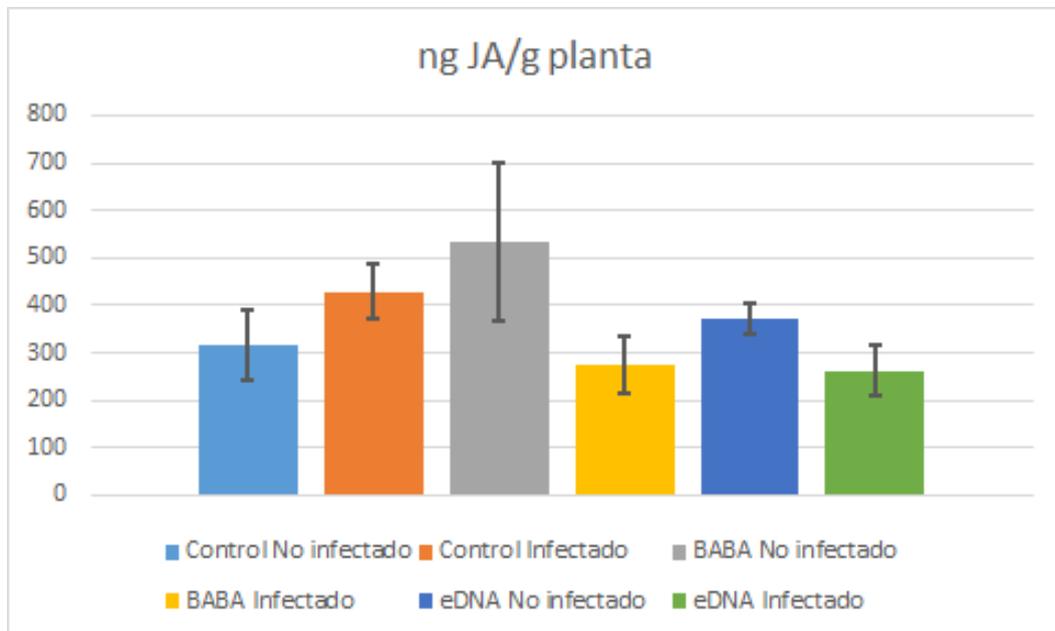
Dentro de cada tratamiento en las plantas Control, los resultados no son significativamente distintos, pero sí que se observa una tendencia ascendente de un 26% en el caso de las plantas infectadas frente a las no infectadas. En el caso de las plantas tratadas con BABA se observa que la tendencia es de un 48% descendente en el caso de las plantas infectadas frente a las no infectadas. En las plantas tratadas con eDNA, las diferencias entre los valores de las plantas infectadas y las no infectadas no son significativamente distintos, pero sí que se puede observar una tendencia descendente de entorno al 30% de el contenido en JA en las plantas infectadas.

Entre los tratamientos, se puede observar que en el caso de las plantas no infectadas, no se aprecian diferencias significativas, pero en las plantas Control se observa un descenso del 40% respecto a las plantas tratadas con BABA y un descenso del 15% respecto a las plantas tratadas con eDNA. La tendencia observada entre las plantas tratadas con eDNA y las tratadas con BABA es un descenso del 30% en el contenido de JA en el caso de las plantas tratadas con eDNA.

En el caso de las plantas infectadas, se observan diferencias significativas entre el contenido de JA entre las plantas Control y las plantas tratadas con eDNA observándose un descenso de un 39% en el contenido en JA de las plantas tratadas con eDNA. En el caso de las plantas tratadas con BABA las diferencias no son significativas, pero se observan tendencias de un descenso del 36% frente a las plantas Control y un aumento de apenas un 5% frente a las tratadas con eDNA.

Control Inf-Control no Inf	0,147208278
BABA Inf-BABA no Inf	0,114997777
eDNA Inf-eDNA no Inf	0,067408136
Control Inf-BABA Inf	0,06212212
Control Inf-eDNA Inf	0,04113379
BABA Inf-eDNA Inf	0,43912808
Control no Inf-BABA no Inf	0,15235276
Control no Inf-eDNA no Inf	0,26611024
BABA no Inf-eDNA no Inf	0,20875603

Tabla 21. Tabla resultados t-test JA.



Gráfica 9. Contenido hormonal en JA. $N_{cni} = 4, N_{ci} = 4, N_{Dni} = 4, N_{Di} = 4, N_{Bni} = 4, N_{Bi} = 4$.

4.4.4. I3CA

En lo relativo al contenido en I3CA en las plantas estudiadas se muestran los resultados en la **Gráfica 10**.

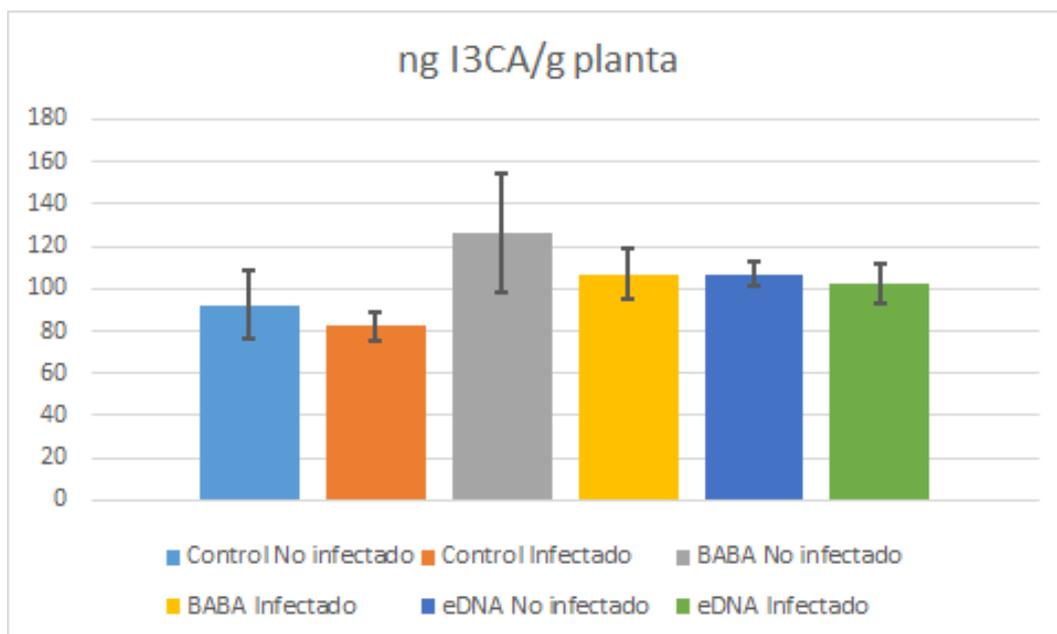
Dentro de cada tratamiento se puede observar que en los tres casos estudiados los valores no son significativamente distintos. En el caso de las plantas Control, se aprecia una tendencia descendente en las plantas infectadas de apenas un 11%. En las plantas tratadas con BABA se puede ver una tendencia descendente en las plantas infectadas de un 15%. En el caso de las plantas tratadas con eDNA la diferencia es de apenas un 4%, siendo menor en las plantas infectadas.

Entre los tratamientos no se observan diferencias significativas, pero se pueden observar las siguientes tendencias, en el caso de las plantas no infectadas, en las plantas Control se observa un descenso de un 27% y un 14% en comparación con las plantas tratadas con BABA y eDNA respectivamente. En las plantas tratadas con eDNA frente a las plantas tratadas con BABA podemos observar una tendencia descendente de un 15% en las plantas tratadas con eDNA.

En el caso de las plantas infectadas, en las plantas Control se observa un descenso de 23% y un 20% en el contenido de I3CA frente a las plantas tratadas con BABA y eDNA respectivamente. Las plantas tratadas con eDNA muestran un 4% menos de I3CA que las plantas tratadas con BABA.

Control Inf-Control no Inf	0,304559954
BABA Inf-BABA no Inf	0,284281574
eDNA Inf-eDNA no Inf	0,284281574
Control Inf-BABA Inf	0,074594268
Control Inf-eDNA Inf	0,065314401
BABA Inf-eDNA Inf	0,392176434
Control no Inf-BABA no Inf	0,17507803
Control no Inf-eDNA no Inf	0,222990989
BABA no Inf-eDNA no Inf	0,275861725

Tabla 22. Tabla resultados t-test I3CA.



Gráfica 10. Contenido hormonal en I3CA. $N_{cni} = 4, N_{ci} = 4, N_{Dni} = 4, N_{Di} = 4, N_{Bni} = 4, N_{Bi} = 4$.

4.4.5. IAA

En lo referente al contenido en IAA en las plantas estudiadas se muestran los resultados en la **Gráfica 11**.

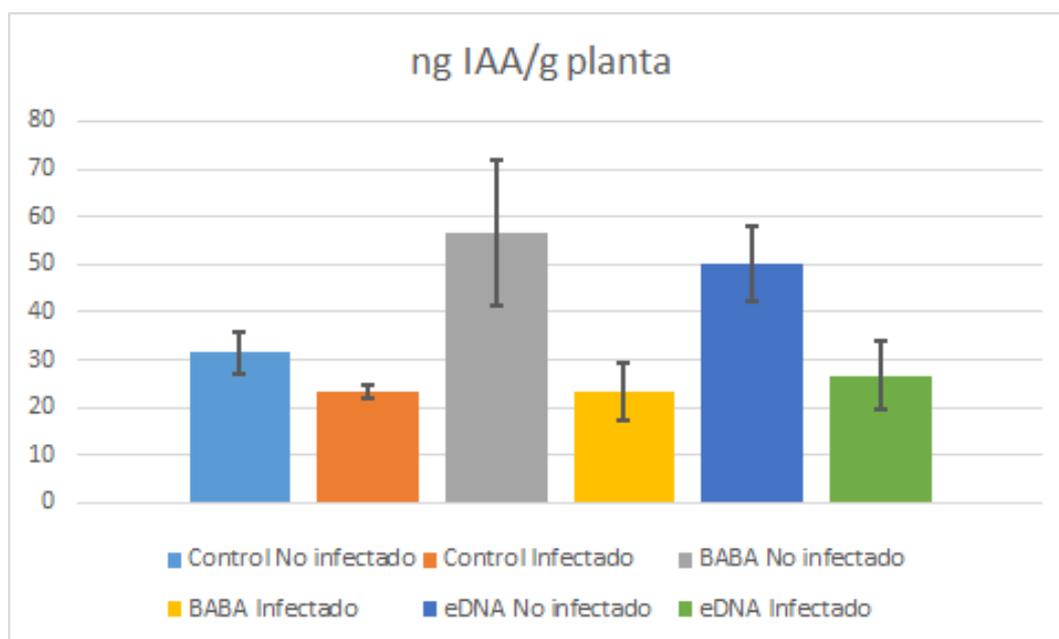
Dentro de cada tratamiento se puede observar en las plantas Control, los resultados de las plantas infectadas y de las no infectadas no son significativamente distintos, pero se observa una tendencia descendente de un 25% en el contenido de IAA de las plantas infectadas frente a las no infectadas. En lo referente a las plantas tratadas con BABA se observa un descenso de casi un 60% en el caso de las plantas infectadas. Por último en las plantas tratadas con eDNA las diferencias entre los resultados de las plantas infectadas se observa un descenso de entorno al 50% en el contenido de IAA en las plantas infectadas, frente a las plantas no infectadas.

Entre los tratamientos en el caso de las plantas no infectadas, las diferencias son significativas en el contenido de IAA en el caso de las plantas Control frente a las tratadas con BABA, en las que se observa una disminución del 45% en el contenido de IAA de las plantas Control. El contenido en IAA en el caso de las plantas tratadas con eDNA se observa una tendencia descendente de un 11% en el contenido frente a BABA y una tendencia ascendente de un 38% frente a las plantas control.

En el caso de las plantas infectadas no se observan diferencias significativas, en las plantas Control frente a las tratadas con BABA no se aprecian diferencia alguna, en el caso de las plantas tratadas con eDNA se observa un aumento del 13% frente al contenido en IAA de las plantas Control y las plantas tratadas con BABA.

Control Inf-Control no Inf	0,08933017
BABA Inf-BABA no Inf	0,048729797
eDNA Inf-eDNA no Inf	0,036543416
Control Inf-BABA Inf	0,493727145
Control Inf-eDNA Inf	0,334248113
BABA Inf-eDNA Inf	0,359173823
Control no Inf-BABA no Inf	0,102149792
Control no Inf-eDNA no Inf	0,049796368
BABA no Inf-eDNA no Inf	0,36446016

Tabla 23. Tabla resultados t-test IAA.



Grafica 11. Contenido hormonal en IAA. $N_{cni} = 4, N_{ci} = 4, N_{Dni} = 4, N_{Di} = 4, N_{Bni} = 4, N_{Bi} = 4$.

4.4.6. OPDA

En lo referente al contenido en OPDA en las plantas estudiadas se muestran los resultados en la **Gráfica 12**.

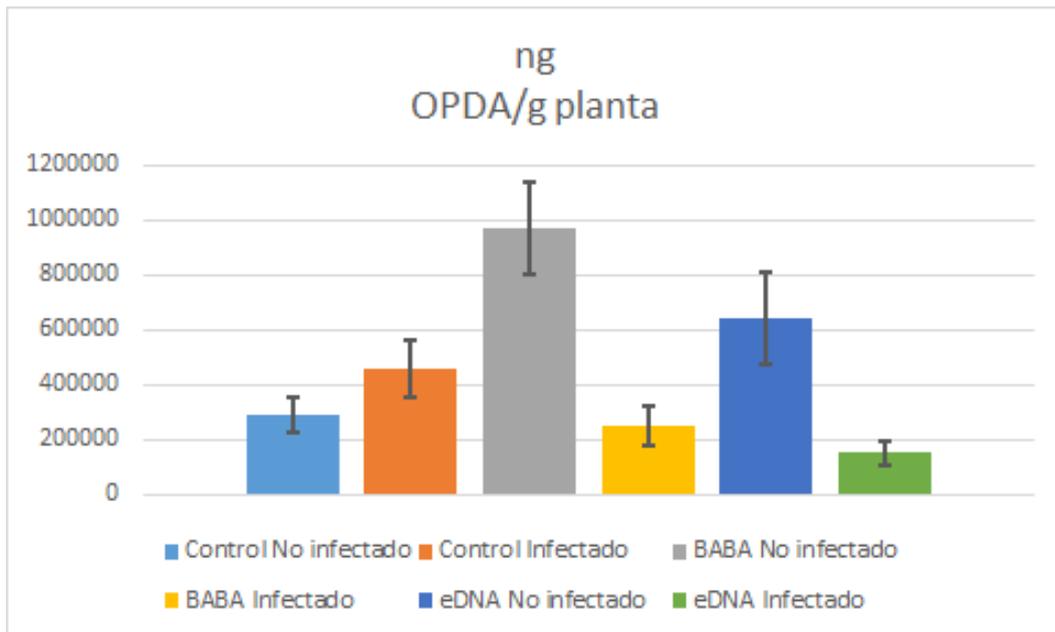
Dentro de cada tratamiento se puede observar que en las plantas Control, los resultados de las plantas infectadas y de las no infectadas no son significativamente distintos, pero se observa una tendencia ascendente de un 37% en el contenido de OPDA de las plantas infectadas frente a las no infectadas. En lo referente a las plantas tratadas con BABA se observa un descenso significativo de casi un 75% en el caso de las plantas infectadas. Por último en las plantas tratadas con eDNA las diferencias entre los resultados de las plantas infectadas son significativas, observándose un descenso de entorno al 76% en el contenido de OPDA en las plantas infectadas, frente a las plantas no infectadas.

Entre los tratamientos, se puede observar que en el caso de las plantas no infectadas, se observa en las plantas Control una tendencia descendente del 55% respecto a las plantas tratadas con eDNA y un descenso significativo del 70% respecto a las plantas tratadas con BABA. En lo que respecta a las plantas tratadas con eDNA frente a las plantas tratadas con BABA se observa una tendencia descendente de un 34% en el contenido en OPDA de las plantas tratadas con eDNA frente a las tratadas con BABA.

En el caso de las plantas infectadas, en las plantas Control se observa una tendencia ascendente de un 46% frente a las plantas tratadas con BABA y un aumento significativo del 67% en el contenido de OPDA en las plantas tratadas con eDNA. En lo referente al tratamiento de eDNA frente a BABA se observa una tendencia descendente del 38% en el contenido en OPDA de las plantas tratadas con eDNA frente a las tratadas con BABA.

Control Inf-Control no Inf	0,11281716
BABA Inf-BABA no Inf	0,008822029
eDNA Inf-eDNA no Inf	0,029796064
Control Inf-BABA Inf	0,075370691
Control Inf-eDNA Inf	0,025923644
BABA Inf-eDNA Inf	0,157874812
Control no Inf-BABA no Inf	0,011254049
Control no Inf-eDNA no Inf	0,064281268
BABA no Inf-eDNA no Inf	0,112743015

Tabla 24. Tabla resultados t-test OPDA.



Gráfica 12. Contenido hormonal en OPDA. $N_{cni} = 4, N_{ci} = 4, N_{Dni} = 4, N_{Di} = 4, N_{Bni} = 4, N_{Bi} = 4$.

4.3.7. Kinetina

En lo referente al contenido en Kinetina en las plantas estudiadas se muestran los resultados en la **Gráfica 13**.

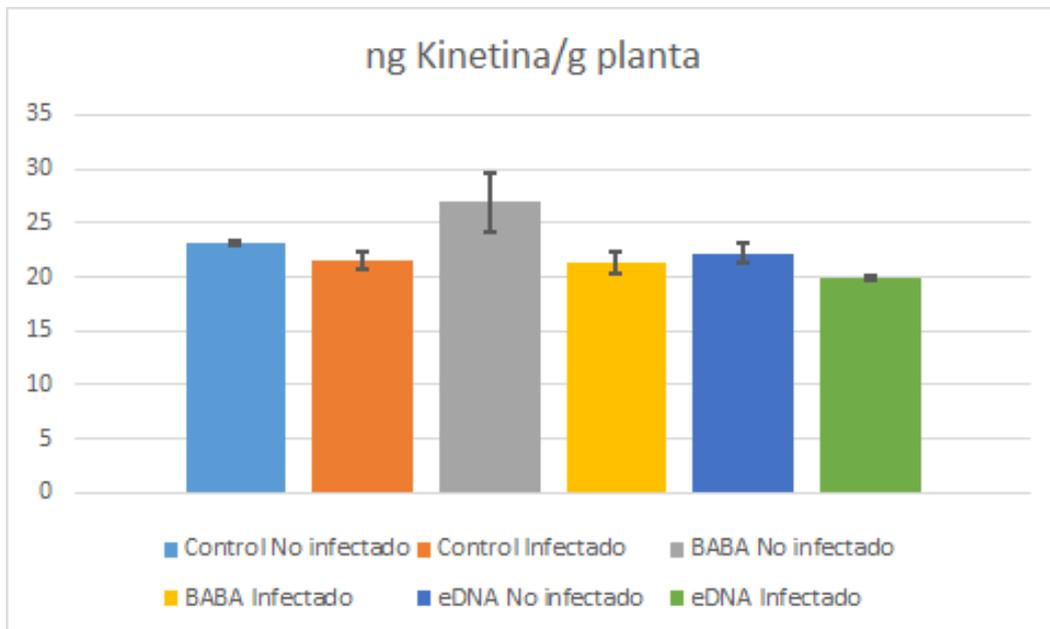
Dentro de cada tratamiento en las plantas Control, las diferencias no son significativas pero se observa una tendencia descendente de un 7% en las plantas infectadas frente a las no infectadas. En las plantas tratadas con BABA se observa una tendencia descendente de alrededor del 20% del contenido en Kinetina de las plantas infectadas frente a las no infectadas. Por último en las plantas tratadas con eDNA se observa una diferencia significativa, viéndose una reducción de alrededor de un 10% en el caso de las plantas infectadas.

Entre tratamientos, se puede observar en las plantas no infectadas, la diferencia en el contenido en Kinetina en las plantas Control en comparación con el contenido en las plantas tratadas con eDNA y con BABA no es significativo, observándose una tendencia descendente de un 14% en comparación con las plantas tratadas con BABA y una tendencia ascendente de un 4% en comparación con las tratadas con eDNA. La tendencia observada entre las plantas tratadas con eDNA en comparación con las tratadas con BABA es de un descenso de un 17% en el contenido de las plantas tratadas con eDNA frente a las tratadas con BABA.

En el caso de las plantas infectadas, las diferencias en los contenidos en Kinetina no son significativas, en las plantas Control se observa una tendencia ascendente de un 1% en comparación con las plantas tratadas con BABA y un aumento de un 8% en comparación con las plantas tratadas con eDNA. En el caso de la comparación entre las plantas tratadas con eDNA y BABA se observa una tendencia ascendente de un 7% en el contenido de Kinetina en las plantas tratadas con eDNA.

Control Inf-Control no Inf	0,085962961
BABA Inf-BABA no Inf	0,071003887
eDNA Inf-eDNA no Inf	0,043035177
Control Inf-BABA Inf	0,444827487
Control Inf-eDNA Inf	0,073592462
BABA Inf-eDNA Inf	0,122794988
Control no Inf-BABA no Inf	0,132908891
Control no Inf-eDNA no Inf	0,210065548
BABA no Inf-eDNA no Inf	0,096875163

Tabla 25. Tabla resultados t-test Kinetina.



Gráfica 13. Contenido hormonal en Kinetina. $N_{cni} = 4, N_{ci} = 4, N_{Dni} = 4, N_{Di} = 4,$
 $N_{Bni} = 4, N_{Bi} = 4.$

4.3.8. Benzylaminopurine

En lo referente al contenido en Bencilaminopurina en las plantas estudiadas se muestran los resultados en la **Gráfica 14**.

Dentro de cada tratamiento las diferencias no son significativas, pero se pueden observar las siguientes tendencias, caso de las plantas Control se observa una tendencia descendente de un 5% en el contenido de Bencilaminopurinas en las plantas infectadas, frente a las no infectadas, en el caso de las plantas tratadas con BABA se observa un descenso de un 27% en las plantas infectadas frente a las no infectadas y en el caso de las plantas tratadas con eDNA la variación es de apenas un 3%, aumentando en el caso de las plantas infectadas.

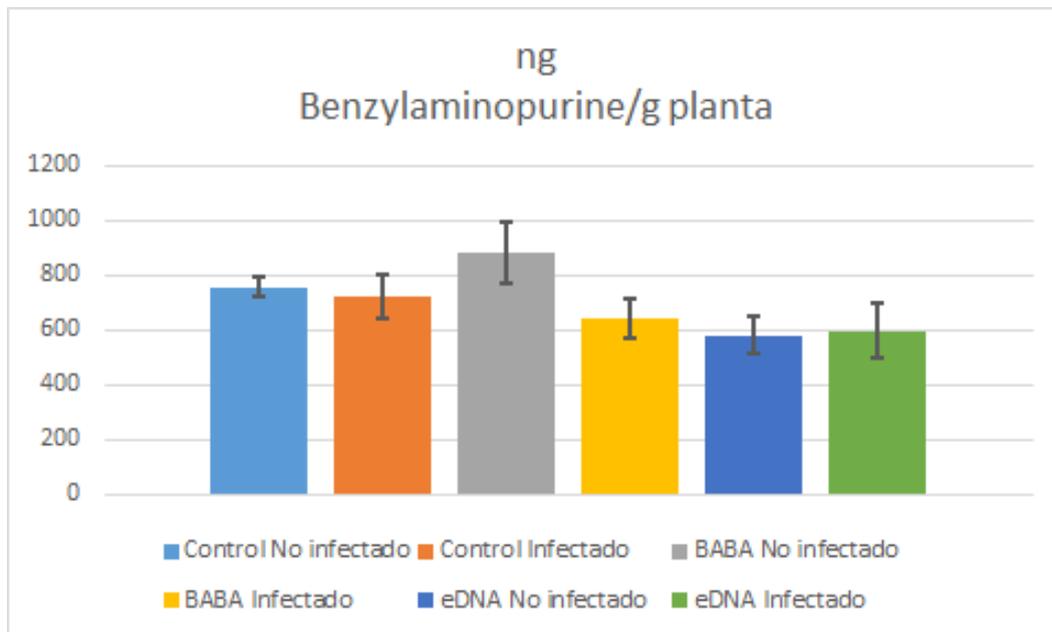
Entre tratamientos, en las plantas no infectadas, se observan diferencias significativas entre las plantas tratadas con eDNA con las plantas Control y con las plantas tratadas con BABA, viendo un descenso del 23% en comparación con las plantas Control y un descenso de un 30% en comparación con las plantas tratadas con BABA. En lo referente a las diferencias entre las plantas Control y las plantas tratadas con BABA no son significativas, pero se observa una tendencia ascendente en el contenido de Bencilaminopurina en las plantas tratadas con BABA frente a las plantas Control.

En el caso de las plantas infectadas, no se observan diferencias significativas, pero las tendencias vistas son un aumento del 11% en el contenido de las plantas Control frente a las plantas tratadas con BABA y del 17% en el caso de las plantas tratadas con eDNA. En lo referente a las diferencias entre las plantas tratadas con eDNA y BABA se observa una tendencia descendente de un 7% en el contenido en Bencilaminopurinas en las plantas tratadas con eDNA frente a las tratadas con BABA.

Control Inf-Control no Inf	0,353202795
BABA Inf-BABA no Inf	0,07031837
eDNA Inf-eDNA no Inf	0,454708814
Control Inf-BABA Inf	0,245396478
Control Inf-eDNA Inf	0,188208961
BABA Inf-eDNA Inf	0,365152119
Control no Inf-BABA no Inf	0,186214956
Control no Inf-eDNA no Inf	0,042893462

BABA no Inf-eDNA no Inf	0,039070167
-------------------------	-------------

Tabla 26. Tabla resultados t-test Bencilaminopurina.



Gráfica 14. Contenido hormonal en Bencilaminopurina. $N_{cni} = 4, N_{ci} = 4, N_{Dni} = 4,$
 $N_{Di} = 4, N_{Bni} = 4, N_{Bi} = 4.$

DISCUSIÓN

6. Discusión

En este estudio se ha investigado la posible generación de resistencia inducida en *Cucurbita pepo* frente a *Podosphaera xanthii* mediante los tratamientos de BABA y eDNA y en *Arabidopsis thaliana* frente a *Hyaloperonospora arabidopsidis* mediante los tratamientos de BABA, eDNA y I3CA.

La inducción de resistencia mediante diversos tratamientos ya sean sintéticos o naturales está ampliamente documentada, algunos de estos componentes químicos son el BABA, el probenazol, el benziotiadiazol, SA, indole-3-carboxylic acid, JA, ABA y otros. Dado que los mecanismos moleculares detrás de la resistencia inducida mediante sustancias químicas no se comprenden completamente, es difícil clasificarlos como estímulos primarios (19).

Una gran cantidad de estudios han demostrado la efectividad de BABA en la generación de resistencia inducida en una gran cantidad de especies vegetales y frente a una gran cantidad de patógenos en lo relativo a este estudio, se ha demostrado sobradamente la efectividad de BABA en la inducción de resistencia en *Arabidopsis thaliana* frente a *Hyaloperonospora arabidopsidis* (20) también se ha probado su efectividad en *Cucurbita pepo* frente a *Podosphaera xanthii* (21).

En lo referente a los tratamientos con I3CA, es un compuesto que se ha visto hace poco tiempo que está implicado en la acumulación de callosa, por lo que hay pocos estudios sobre la generación de resistencia inducida. Si que se ha visto que genera resistencia inducida en plantas de *A. thaliana* frente a *Plectosphaerella cucumerina* (8) induciendo una acumulación de callosa.

Por la parte de los tratamientos de eDNA al igual que con los tratamientos de I3CA no se han hecho tantos experimentos como con BABA, pero sí que se ha visto que el eDNA de la misma especie actúa como damage-associated molecular pattern (DAMP) induciendo respuestas más veloces de acumulación de H₂O₂ y activación de MAPK (12) también se ha visto que los tratamientos con eDNA generan acumulación de Ca²⁺ (22). La falta de estudios centrados en la inducción de resistencia mediante tratamientos de eDNA ha sido una de las principales motivaciones de este estudio.

Teniendo en cuenta la información disponible anteriormente, se procede a discutir los resultados obtenidos de los experimentos que conforman este estudio.

Empezando por el Experimento 1 la efectividad de BABA en la generación de resistencia inducida en *A. thaliana* frente a *Hyaloperonospora arabidopsidis* está sobradamente demostrada. Las plantas tratadas con BABA se produce una reducción de la esporulación de hasta el 98% en comparación con las plantas Control además de reducirse un 85% el ratio de infección respecto a las plantas Control, resultados los cuales coinciden con los experimentos ya realizados con anterioridad. A pesar de verse una reducción tan grande en la esporulación la disminución de la infección en comparación con las plantas Control es menor, observándose un 13% de diferencia en la disminución.

En el caso de la efectividad de los tratamientos con I3CA, hay poco publicado y en la mayoría de los casos estas publicaciones son en *A. thaliana* frente a *P. cucumerina*, el cual es un hongo ascomiceto necrótrofo en nuestro estudio lo realizamos con *A. thaliana* frente a *H. arabidopsidis* el cual es un oomiceto biotrófico obligado por lo cual se esperan resultados similares, pero no iguales. Se ha visto que en las plantas tratadas con I3CA se produce una reducción de la esporulación del 19% y una reducción del 20% del ratio de infección respecto a las plantas Control. A diferencia de las plantas tratadas con BABA en las tratadas con I3CA no se aprecia una diferencia entre la reducción observada en el conteo de espora y en las tinciones.

En lo referente a tratamientos con eDNA apenas hay literatura publicada, si que se ha visto cierto efecto en la inducción de resistencia en diversas especies vegetales, pero nunca se ha probado en *A. thaliana* frente a *H. arabidopsidis*. En este estudio se ha visto que en las plantas tratadas con eDNA se ha reducido la esporulación en un 25% y el ratio de infección en un 26% respecto a las plantas Control. Igual que con las plantas tratadas con I3CA no se aprecia una diferencia entre la reducción observada en el conteo de espora y en las tinciones.

Obteniéndose los mejores resultados con el tratamiento de BABA, seguidos por los resultados obtenidos mediante eDNA y I3CA, siendo las diferencias entre estos tratamientos siendo las diferencias entre estos tratamientos no significativas y de menos de un 7% tanto en la esporulación como en las tinciones, siendo menor en el caso de las plantas tratadas con eDNA. Estos resultados se muestran gráficamente en las **Gráficas 1**

y 2. Siendo los resultados del Experimento 1 muy interesantes y abren nuevas líneas en la investigación de resistencia inducida.

Los resultados obtenidos de los Experimentos 2 y 3 se van a discutir juntos ya que la única diferencia entre ambos experimentos es que en el experimento 3 se introdujo el tratamiento de I3CA ya que se vio en el Experimento 1 que daba resultados interesantes para ver si sucedía lo mismo con el calabacín.

En lo relativo a los tratamientos con BABA se puede observar una disminución de la esporulación de alrededor de un 65% (60% en E2 y 70% en E3) y el ratio de la infección se ha reducido en general sobre un 55% (50% en E2 y 57% en E3). Al igual que sucedía en el Experimento 1 se observa una disminución en la reducción del ratio de infección frente al conteo de esporas de entorno un 15%, resultados los cuales coinciden más o menos con las disminuciones apreciadas en el E1.

Por lo que se refiere a el tratamiento con BABA convendría hacer un estudio de cuál es la concentración óptima para el tratamiento, por que se ha podido observar en otros estudios que a mayores concentraciones en el tratamiento se obtienen mejores resultados, abriendo una vía de investigación para encontrar la concentración óptima de tratamiento ya que a altas temperaturas pueden llegar a producirse daños en la planta.

En el caso de los resultados obtenidos en las plantas tratadas con I3CA, que como se ha comentado antes solo se ha probado en el Experimento 3, se ha podido observar una reducción de la esporulación de entorno al 50% y en el caso del ratio de infección se observa una reducción de entorno al 35%. Entre la reducción de la esporulación y la reducción en la infección se observa al igual que en el tratamiento de BABA una reducción de alrededor del 30%. Los resultados observados con el tratamiento de I3CA en calabacín son mejores que los observados en *A. thaliana*.

En las plantas tratadas con eDNA se ha observado una disminución de la esporulación de alrededor de un 40% (54% en E2 y 25% en E3) y el ratio de la infección se ha reducido en general sobre un 30% (17% en E2 y 40% en E3). Al igual que sucedía en el Experimento 1 se observa una disminución en la reducción del ratio de infección frente al conteo de esporas de entorno a un 25%.

Estos resultados son muy interesantes ya que concuerdan parcialmente con los obtenidos en arabis, además que se observe mayor reducción en la esporulación

comparado con el ratio de infección podría mostrar que estos tratamientos también hacen que sea más difícil el ciclo secundario en el que se produce la transmisión planta-planta. Al ser tratamientos novedosos se han usado las concentraciones aplicadas en *A. thaliana* por lo que habría que hacer estudios con cada uno de los tratamientos para ajustar la concentración a aplicar como se ha comentado en el caso de BABA.

Para completar estos resultados obtenidos en calabacín, para poder entender los mecanismos celulares que activan los tratamientos se ha realizado un análisis del contenido hormonal en las plantas tratadas y a continuación se discutirán los resultados obtenidos en estos análisis hormonales.

Como se ha comentado anteriormente ABA está implicado en el cierre estomático y es una hormona antagónica con las hormonas de interacción patógeno planta, por lo cual lo interesante sería que en las plantas infectadas la cantidad de ABA se redujera en las plantas infectadas, en el caso de las plantas tratadas con BABA se observa una importante reducción de alrededor del 70% y también pasa algo similar en el caso de las plantas tratadas con eDNA observándose una reducción del 65% cosa que no pasa en las plantas Control en las que únicamente se observa una tendencia descendente del 7%.

Los resultados en las plantas infectadas son muy interesantes porque en las plantas tratadas con BABA y con eDNA se observa una reducción del 50% en el contenido de ABA frente a las plantas Control. Siendo estos resultados favorables ante la defensa de la planta frente al patógeno.

Por contraparte como se ha comentado anteriormente el sistema de priming tiene un coste, en este sentido, en las plantas no infectadas tratadas con BABA y con eDNA se observa un aumento del 40% y el 23% en el contenido de ABA respecto a las plantas Control, lo cual podría conllevar un mayor cierre estomático por lo que se reduciría la actividad fotosintética y se generaría una reducción en el crecimiento vegetativo.

SA se ha visto que está implicado en la SAR y en la expresión de genes de resistencia PR, siendo una hormona efectiva contra patógenos biotrofos, como es en nuestro estudio, por lo que habría que observar un aumento en la cantidad de SA en las plantas infectadas frente a las no infectadas. En el caso de las plantas tratadas con BABA se observa un aumento de entorno al 30% en las plantas infectadas frente a las no infectadas, al igual que pasa en las plantas tratadas con eDNA, pero siendo esta

variación de entorno al 35%, en el caso de las plantas Control sucede todo lo contrario y se observa una disminución de casi un 50% en el caso de las plantas infectadas. Esta reducción podría venir dado porque el patógeno es capaz de confundir a la planta y hacer que esta reaccione de una forma contraproducente, reduciendo la producción de SA activando las rutas antagonicas como la del JA, siendo esto contraproducente frente a un patógeno biotrófico, pero esto no sucede en el caso de las plantas tratadas con BABA e eDNA, pudiendo observarse una mejora en la respuesta frente a este patógeno consiguiendo que el patógeno no confunda a la planta, por lo que mediante los tratamientos de BABA y eDNA se consigue que la planta responda de forma más eficiente. esto también se puede ver al comparar las plantas infectadas de cada tratamiento, entre las cuales se puede observar una diferencia muy grande entre los contenidos en SA en las plantas tratadas y las Control, conteniendo un 60% más las plantas tratadas con BABA y un 50 % más en las plantas tratadas con eDNA.

Se ha observado que JA promueve la activación de diversos genes de defensa como puede ser el gen PDF1.2 (efectivo frente a herbívoros) y VSP2 (contra necrotrofos), también es responsable del metil-jasmonato y muy a destacar es la ruta antagonica del SA con todo esto, al estar estudiando un patógeno biotrofo la respuesta óptima es un descenso en el contenido de JA en las plantas infectadas. En el caso de las plantas tratadas con BABA se observa un descenso de casi un 50% en el contenido de JA en las plantas infectadas frente a las no infectadas y en las plantas tratadas con eDNA se observa también un descenso de un 30% en el contenido de JA en las plantas infectadas, por otro lado, en las plantas Control se observa una subida en el contenido de JA en las planta que están infectadas. Esto nos hace pensar que los tratamientos de BABA y de eDNA inducen una respuesta más efectiva en lo referente al JA.

En contraposición se ha visto que altas concentraciones de JA influyen en el cierre estomático, reduciendo el crecimiento y se observa que en las plantas tratadas sin infectar los niveles de JA son mayores en el caso de las plantas tratadas con BABA y eDNA en comparación con las Control, siendo estas diferencias de un 40% y un 15% respectivamente, observándose el coste del priming.

I3CA se ha visto que está involucrado en la acumulación de callosa y por ende en el refuerzo de la pared celular. En el caso de este estudio las diferencias observadas entre los distintos tratamientos son mínimas, si que se observa que las plantas tratadas con BABA y con eDNA tienen un mayor contenido en I3CA que las plantas Control. En

todos los casos se observa una mínima tendencia descendente de las plantas infectadas, frente a las no infectadas.

La función principal de IAA es el crecimiento y la diferenciación celular, por lo que al estar estudiando a un patógeno biotrofo no es interesante que haya una renovación constante de células nuevas de las que se siga alimentando el patógeno, si no que haya una muerte de las células infectadas por este aunque en el caso de las plantas no infectadas si que sería interesante ver un aumento en el contenido de IAA de las plantas tratadas frente a las Control. En las plantas tratadas con BABA se observa una reducción del 60% en el contenido de IAA en las plantas infectadas frente a las no infectadas al igual que sucede en el caso de las plantas tratadas con eDNA en las que se observa un descenso de un 50%. Por otro lado el descenso observado entre plantas infectadas y no infectadas en las Control es mucho menor que el observado en las plantas tratadas con BABA y eDNA, siendo este descenso de un 25%.

Como se ha comentado anteriormente sería muy interesante que sucede con el contenido de IAA en el caso de las plantas no infectadas, ya que a mayor cantidad de IAA mayor división celular, en el caso de las plantas tratadas con BABA y con eDNA se observ un aumento de un 45% y un 38% en el contenido de IAA frente a las plantas Control, lo cual podría significar que las plantas están creciendo más en el caso de las tratadas.

OPDA es un precursor de el JA por lo que como se ha comentado al tratarse de un patógeno biotrofo no es interesante que se presenten aumentos en el contenido de JA, por ende que no se produzcan aumentos de OPD entre plantas no infectadas y plantas infectadas. Lo observado en el caso de las plantas tratadas con BABA y con eDNA es muy llamativo ya que se observa un descenso en ambos casos de un 75% en el contenido de OPDA de las plantas no infectadas frente a las no infectadas y en contraposición en las plantas Control se aprecia un aumento de un 35% del contenido en las plantas infectadas frente a las no infectadas. Estos resultados concuerdan con los observados en JA ya que al tratarse de un precursor de este si aumenta el contenido en OPDA, aumenta el contenido en JA.

Al igual que en el caso de JA en el caso de las plantas no infectadas, las que mayor cantidad de OPDA contienen son las tratadas con BABA, seguidas de las tratadas con eDNA.

La Kinetina es una citoquinina por lo que su función está relacionada con la división celular al igual que las auxinas, por lo que al estar estudiando un patógeno biotrofo no nos interesaría que se produjera mucha división celular en el caso de las plantas infectadas. Se ha observado una reducción en el contenido de Kinetina en todos los tratamientos en el caso de las plantas infectadas, en las plantas tratadas con BABA esta reducción es del 20%, en el caso de las tratadas con eDNA es de un 10% y en el caso de las Control la reducción es del 10%.

Bencilaminopurina al igual que la Kinetina es una citoquinina por lo que al igual que con la Kinetina lo interesante sería observar una reducción en el contenido de Bencilaminopurina en el caso de las plantas infectadas frente a las no infectadas, cosa que sí que se observa en los resultados en el caso de las plantas tratadas con BABA, siendo estas reducciones de un 27% en el caso de BABA, en el caso de las plantas Control y de tratadas con eDNA las variaciones son mínimas.

CONCLUSIONES

7. Conclusiones

En *Arabidopsis thaliana* frente a HPA ya se sabía la efectividad del tratamiento de BABA y se habían realizado bastantes estudios por lo que las concentraciones de tratamiento de BABA son más que conocidas y están optimizadas, los resultados vistos en el estudio son espectaculares, y se puede afirmar que BABA genera resistencia inducida en *Arabidopsis thaliana* frente a HPA.

En el caso de los tratamientos con eDNA y con I3CA se ha visto cierto nivel de efectividad, pero al haber muchos menos estudios las concentraciones de tratamiento no están claras del todo, por lo que habría que hacer estudios para encontrar las concentraciones de tratamiento óptimas ya que existe la posibilidad de que al aumentar las concentraciones se potencie esta resistencia frente a HPA.

Además sería interesante realizar un análisis hormonal para completar la información obtenida del conteo de esporas y de las tinciones realizadas.

En *Cucurbita pepo* frente a *P. xanthii* teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los tres estudios podemos decir que genera cierto grado de resistencia inducida, observándose una respuesta más eficaz contra el patógeno como se ha comentado en la discusión, pero para obtener unos mejores resultados y asemejarse a los obtenidos con BABA en *A. thaliana* habría que ajustar la concentración aplicada para calabacín, por lo que habría que hacer un estudio para ver qué concentración es la óptima a aplicar.

Los efectos de I3CA al solo realizar un experimento no se puede afirmar que genere resistencia inducida, pero sí que se puede observar que es un tratamiento que genera un efecto positivo en calabacín frente a *P. xanthii* por lo que sería una vía de investigación muy interesante para seguir en el futuro.

Los efectos observados con el tratamiento de eDNA en *C. pepo* son muy prometedores ya que se observa una mejora respecto a las plantas control, al igual que sucede con los demás tratamientos al no haberse realizado casi ningún estudio habría que estudiar la concentración óptima para aplicar y mejorar los resultados obtenidos en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

1. **M. Miazzi, C. Laguardia, F. Faretra** (2011) Variation in *Podosphaera xanthii* on Cucurbits in Southern Italy. *J Phytopathol* 159:538–545.
2. **R. Félix, M. Apodaca, M. Martínez, S. Espinosa** (2005) *Podosphaera* (sect. *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castagne) U. Brawn y N. Shishkoff en Cucurbitáceas en el Norte de Sinaloa, México *Revista Mexicana de Fitopatología* 162-168
3. **N. González B. Martínez Coca, D. Infante** (2009) POWDERY MILDEW ON CUCURBITS disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-2752201000010009
4. EL CULTIVO DEL CALABACÍN EN ARAGÓN Estudio de variedades con destino industrial disponible en: http://bibliotecavirtual.aragon.es/bva/i18n/catalogo_imagenes/grupo.cmd?path=3705325
5. **Yael Meller** PROTEÍNAS QUE DEFIENDEN LAS PLANTAS disponible en: http://www.divulgacion.ccg.unam.mx/webfm_send/8584
6. **M. Jordán & J. Casaretto** Fisiología vegetal capitulos XV y XVI disponible en: <http://www.biouls.cl/librofv/web/index03.php>
7. **J. Pastor-Fernández, V. Pastor, D. Mateu, J. Gamir, P. Sánchez-Bel, and V. Flors** (2019) Accumulating evidences of callose priming by indole-3-carboxylic acid in response to *Plectosphaerella cucumerina* PLANT SIGNALING & BEHAVIOR, VOL. 14, NO. 7
8. **V. Pastor, D. Mateu, J. Gamir, P. Sánchez-Bel, J. García-Andrade and V. Flors** (2018) Starch degradation, abscisic acid and vesicular trafficking are important elements in callose priming by indole-3-carboxylic acid in response to *Plectosphaerella cucumerina* infection *Plant J.* 96, 518–531
9. **Jorge Vicente Conde** (2012), ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y FUNCIONAL DE OXILIPINAS INVOLUCRADAS EN DEFENSA FRENTE A PATÓGENOS disponible en: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/8206/45102_vicente_conde_jorge.pdf?sequence=1&isAllowed=y
10. **Mary E. Coates and Jim L. Beynon** (2010) *Hyaloperonospora arabidopsidis* as a Pathogen Model, *Annual Review of Phytopathology* Vol. 48:329-345
11. **M. Nagler, H. Insam, G. Pietramellara, and J. Ascher-Jenull** (2018) Extracellular DNA in natural environments: features, relevance and applications, *Appl Microbiol Biotechnol.*; 102(15): 6343–6356.
12. **D. Duran-Flores and M. Heil** (2018) Extracellular self-DNA as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that triggers self-specific immunity induction in plants, *Brain, Behavior, and Immunity* Volume 72 Pages 78-88

13. **G. Jakab, V. Cottier, V. Toquin, G. Rigoli, L. Zimmerli, J. Mètraux and B. Mauch-Mani** (2000) β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants, *European Journal of Plant Pathology* 107: 29–37
14. **Ferrusquía-Jiménez, N. I., Chandrakasan, G., Torres-Pacheco, I., Rico-García, E., Feregrino-Perez, A. A., and Guevara-González, R. G.** (2020). Extracellular DNA: a relevant plant damage-associated molecular pattern (DAMP) for crop protection against pests—a review. *J. Plant Growth Regul.* doi: 10.1007/s00344-020-10129-w
15. **Ferrusquía-Jiménez, N. I., Chandrakasan, G., Torres-Pacheco, I.** (2021) Extracellular DNA: A Relevant Plant Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP) for Crop Protection Against Pests—A Review. *J Plant Growth Regul* 40, 451–463 . <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10129-w>
16. **Cohen, Y., Vakhin, M. & Mauch-Mani, B.** (2016) BABA-induced resistance: milestones along a 55-year journey. *Phytoparasitica* 44, 513–538 . <https://doi.org/10.1007/s12600-016-0546-x>
17. **J. Pastor-Fernández, V. Pastor, D. Mateu, J. Gamir, P. Sánchez-Bel & V. Flors** (2019) Accumulating evidences of callose priming by indole- 3- carboxylic acid in response to *Plectospharella cucumerina*, *Plant Signaling & Behavior*, 14:7, 1608107, DOI:10.1080/15592324.2019.1608107
18. **Ute Krämer** (2015)The Natural History of Model Organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* DOI: 10.7554/eLife.06100
19. **B. Mauch-Mani, I. Baccelli, E. Luna, V. Flors** (2017) Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance *Annual Review of Plant Biology* 2017 68:1, 485-512
20. **Cohen, Y., Vakhin, M. & Mauch-Mani, B.** BABA-induced resistance: milestones along a 55-year journey. *Phytoparasitica* 44, 513–538 (2016). <https://doi.org/10.1007/s12600-016-0546-x>
21. **R. Zeighaminejad, G.R. Sharifi-Sirchi, H. Mohamadi, M.M. Aminai** (2016) Induction of resistance against powdery mildew by Beta aminobutyric acid in squash *Journal of Applied Botany and Food Quality* 89, 176 - 182 (2016), DOI:10.5073/JABFQ.2016.089.022
22. **Barbero, F., Guglielmotto, M., Capuzzo, A., Maffei, M.,** (2016). Extracellular self-DNA(esDNA), but not heterologous plant or insect DNA (etDNA), induces plasma membrane depolarization and calcium signaling in Lima bean (*Phaseolus lunatus*) and Maize (*Zea mays*). *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1659. <https://doi.org/10.3390/ijms17101659>.

A. Treball de final de grau o de final de màster / Trabajo de final de grado o de final de máster

Grau/Màster (denominació oficial) / Grado/Máster (denominación oficial)

Grado Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

Autor o autora / Autor o autora

DNI / DNI

Elena Hinojal Vicente

53727129A

Títol / Título

Resistencia inducida en Arabidopsis thaliana frente a Hyaloperonospora arabidopsidis y en Cucurbita pepo frente a Podosphaera xanthii

B. Vistiplau del tutor o tutora / Visto bueno del tutor o tutora

Nom i cognoms / Nombre y apellidos

Jordi Gamir Felip

Done el vistiplau per a la difusió d'aquest treball en el Repositori UJI
Doy el visto bueno para la difusión de este trabajo en el Repositorio UJI

No done el vistiplau per a la difusió d'aquest treball en el Repositori UJI
No doy el visto bueno para la difusión de este trabajo en el Repositorio UJI

(Firma / Firma)

JORDI|
GAMIR|FELIP

Firmado digitalmente
por JORDI|GAMIR|FELIP
Fecha: 2021.07.01
09:18:57 +02'00'

C. Vistiplau del supervisor o supervisora / Visto bueno del supervisor o supervisora

Nom i cognoms / Nombre y apellidos

Centre o empresa / Centro o empresa

Done el vistiplau per a la difusió d'aquest treball en el Repositori UJI
Doy el visto bueno para la difusión de este trabajo en el Repositorio UJI

No done el vistiplau per a la difusió d'aquest treball en el Repositori UJI
No doy el visto bueno para la difusión de este trabajo en el Repositorio UJI

(Firma / Firma)

Firmado por VICTOR FLORS
HERRERO - NIF:18981675M el día
01/07/2021 con un certificado
emitido por ACCVCA-120

D. Autorització i declaració de l'autor o autora / Autorización y declaración del autor o autora

Com a autor o autora del treball indicat / Como autor o autora del trabajo indicado
Declare / Declaro

1. El document indicat és un treball original elaborat per mi i no infringeix els drets d'autoria d'una altra persona o entitat.
 2. El material amb drets de tercers està clarament identificat i reconegut en el contingut del document lliurat.
 3. Autoritze la Universitat Jaume I a conservar més d'una còpia d'aquest document i, sense alterar-ne el contingut, a transformar-lo en altres formats, suports o mitjans per a garantir-ne la seguretat, preservació i accés.
 4. Aquesta autorització implica que la Universitat Jaume I ha d'identificar clarament el meu nom com a autor o autora o propietari o propietària dels drets d'explotació d'aquest treball i no ha de fer cap alteració del seu contingut diferent de les permeses en aquest document.
 5. Autoritze a reproduir, comunicar i distribuir aquest document mundialment en format electrònic amb caràcter no exclusiu en el Repositori UJI sota la llicència Creative Commons:
 - CC-BY-SA «Reconeixement-Compartir igual». És permesa la reproducció, la distribució, la comunicació pública, la realització d'obres derivades i l'ús comercial sempre que se'n cite l'autoria i amb la mateixa llicència CC o equivalent.
 - CC-BY-NC-SA «Reconeixement-No comercial-Compartir igual». És permesa la reproducció, la distribució, la comunicació pública i la realització d'obres derivades sempre que se'n cite l'autoria i amb la mateixa llicència CC o equivalent, però no és permès fer-ne un ús comercial.
 - CC-BY-NC-ND «Reconeixement-No comercial-Sense obres derivades». És permesa la reproducció, la distribució i la comunicació pública sempre que se'n cite l'autoria, però no és permesa la realització d'obres derivades ni el seu ús comercial.
- No autoritze** la difusió en accés obert d'aquest treball en el Repositori UJI.

1. El documento indicado es un trabajo original elaborado por mí y no infringe los derechos de autoría de otra persona o entidad.
 2. El material con derechos de terceros está claramente identificado y reconocido en el contenido del documento entregado.
 3. Autorizo a la Universitat Jaume I a conservar más de una copia de este documento y, sin alterar su contenido, a transformarlo en otros formatos, soportes o medios para garantizar su seguridad, preservación y acceso.
 4. Esta autorización implica que la Universitat Jaume I deberá identificar claramente mi nombre como autor o autora o propietario o propietaria de los derechos de explotación de este trabajo y no deberá realizar ninguna alteración de su contenido diferente de las permitidas en este documento.
 5. Autorizo a reproducir, comunicar y distribuir este documento mundialmente en formato electrónico con carácter no exclusivo en el Repositorio UJI bajo la licencia Creative Commons:
 - CC-BY-SA «Reconocimiento-Compartir igual». Se permite la reproducción, la distribución, la comunicación pública, la realización de obras derivadas y el uso comercial siempre que se cite la autoría y con la misma licencia CC o equivalente.
 - CC-BY-NC-SA «Reconocimiento-No comercial-Compartir igual». Se permite la reproducción, la distribución, la comunicación pública y la realización de obras derivadas siempre que se cite la autoría y con la misma licencia CC o equivalente, pero no se permite hacer un uso comercial.
 - CC-BY-NC-ND «Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas». Se permite la reproducción, la distribución y la comunicación pública siempre que se cite la autoría, pero no se permite la realización de obras derivadas ni su uso comercial.
- No autorizo** la difusión en acceso abierto de este trabajo en el Repositorio UJI.

(Firma / Firma)

