



UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARÍA  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

Efecto del portainjerto de tomate INIA sobre los mecanismos de  
defensa fisiológicos de la planta injertada de tomate Limachino  
durante la infección por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Juan Felipe Alfaro Quezada

Profesores Guía: Dr. Michael Seeger Pfeiffer

Dr. Juan Pablo Martínez Castillo

Agosto 2019

## Resumen

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* es una de las bacterias más perjudiciales en la producción de tomates para consumo fresco en Chile, provocando importantes pérdidas económicas. La búsqueda de métodos de control inocuos para la salud humana y sustentables con el medio ambiente representa uno de los principales desafíos para el cultivo de tomates libres de fitopatógenos. Los portainjertos han sido ampliamente utilizados para la producción de tomates, contribuyendo a un manejo limpio, especialmente en tomates sensibles a condiciones de estrés biótico como el tomate Limachino. Los portainjertos han sido, además, bastante estudiados como técnicas de control de las diversas enfermedades que se producen donde los elementos antioxidantes, las poliaminas y hormonas de defensa, como el ácido salicílico, tienen una significativa función durante la infección por fitopatógenos. Asimismo, el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), es un compuesto que participa como molécula señalizadora frente a estrés y participa (al igual que otras moléculas) en defensa contra fitopatógenos. De acuerdo con estos antecedentes, la hipótesis de esta tesis postula que el portainjerto de tomate INIA (*Solanum lycopersicum*) proporciona al injerto de tomate Limachino tolerancia a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* activando sus sistemas de defensa. El estudio se focalizó en evaluar el efecto que tiene el portainjerto de tomate INIA sobre los mecanismos de defensa (antioxidantes, poliaminas, ácido salicílico) y la participación del  $H_2S$  como molécula de defensa y de señalización inductora de mecanismo de defensa en plantas de tomate Limachino durante el ataque de este fitopatógeno. Se utilizaron tres tipos de plantas (Limachino/Limachino; Limachino/Portainjerto; Limachino sin injertar), las cuales fueron infectadas con la bacteria evaluando su respuesta en un periodo de 14 días con 3 tiempos de medición (3, 7, 14 días post-inoculación con *Pst* DC3000). Para ello se consideró determinar el daño que produce la bacteria (incidencia, severidad y crecimiento bacteriano) y las respuestas fisiológicas y/o moleculares presentes a nivel foliar. Se evaluó actividad antioxidante no enzimática (ascorbato y glutatión) y enzimática: ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD), y sus genes implicados en esta respuesta de defensa, compuestos como poliaminas (PAs) y ácido salicílico (SA). Los resultados muestran que el portainjerto Poncho Negro incrementó la actividad antioxidante en el injerto de tomate Limachino, a través de los aumentos del contenido de ascorbato (ASA) y expresión génica relativa de *CAT1* y *APX2*. Además, se observó que el portainjerto Poncho Negro indujo una mayor síntesis de  $H_2S$  en plantas de tomate Limachino, lo que produjo una mayor inducción del mecanismo antioxidante (enzimática y no enzimática) y de la síntesis de SA. Se observó también que el  $H_2S$  se asoció a una reducción de la síntesis de etileno durante la infección por *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Se concluye que el uso del portainjerto Poncho Negro redujo el daño de la enfermedad de

la peca bacteriana producida por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en las plantas de tomate Limachino, confiriendo a la planta injertada tolerancia al ataque de este fitopatógeno.

## Abstract

*Pseudomonas syringae pv. tomato* is one of the most harmful bacteria in the production of tomatoes for fresh consumption in Chile, causing significant economic losses. The search for innocuous control methods for human health and sustainable with the environment represents one of the main challenges for the cultivation of tomatoes free of phytopathogens. Rootstocks have been widely used to fresh tomato crop, contributing to clean management, especially in sensitive tomato plant to conditions of biotic stress such as Limachino tomato. Rootstocks have also been well studied as control techniques for the various diseases where the antioxidant elements, polyamines and defense compounds, such as salicylic acid, have a significant role during infection by phytopathogens. Also, hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), is a compound that participates as a signaling molecule against stress and participates in the defense against phytopathogens. According to this background, the hypothesis of this thesis postulates that the tomato rootstock INIA (*Solanum lycopersicum*) provides Limachino tomato graft tolerance to *Pseudomonas syringae pv. tomato* by activating their defense systems. The study focused on evaluating the effect of the INIA tomato rootstock on the defense mechanisms (antioxidants, polyamines, salicylic acid) and participation of H<sub>2</sub>S as defense mechanism signaling molecule in tomato plants Limachino during an attack of this phytopathogen. Three types of plants were used (Limachino/Limachino, Limachino/ Portainjerto, Limachino without grafting), which were infected with the bacteria evaluating their response for 14 days with three measurement times (3, 7, 14 days post- inoculation with *Pst* DC3000). For this, it was considered to determine the damage produced by the bacteria (incidence, severity and bacterial growth) and the physiological and molecular responses present at the leaf level. Non-enzymatic (ascorbate and glutathione) and enzymatic antioxidant activity were evaluated: ascorbate (APX), catalase (CAT), glutathione (GR) and superoxide dismutase (SOD), and their genes involved in this defense response, compounds such as polyamines (PAs) and salicylic acid (SA). The results show that the Poncho Negro rootstock increased the antioxidant activity in Limachino tomato, through increases in the ascorbate content (ASA) and relative expression of *CAT1* and *APX2*. Besides, it was observed that the Poncho Negro rootstock induced a higher synthesis of H<sub>2</sub>S in Limachino tomato plants, which produced a higher induction of the antioxidant mechanism (enzymatic and non-enzymatic) and SA synthesis. It was also observed that H<sub>2</sub>S was associated with a reduction of ethylene synthesis during infection by *P. syringae pv. tomato* DC3000. It is concluded that the use of the Poncho Negro rootstock reduced the damage of the bacterial speck disease produced by *Pseudomonas syringae pv. tomato* in the tomato plants Limachino, conferring to the grafted plant tolerance to the attack of this phytopathogen.