



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Estudio de la inducción de resistencia en suspensiones celulares de pimiento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) mediante la elicitación con extractos de hoja de *Moringa oleifera*

Study of the induction of resistance in cellular suspensions of pepper (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) by elicitation with extracts of *Moringa oleifera* leaf

Estudo da indución de resistencia en suspensións celulares de pemento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) mediante a elicitación con extractos de folla de *Moringa oleifera*



Javier López do Campo

Febrero, 2019

Tutora Académica: Dra. Ángeles Bernal Pita da Veiga
Tutor Académico: Dr. Néstor Carrillo Barral



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Facultad de Ciencias

Estudio de la inducción de resistencia en suspensiones celulares de pimiento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) mediante la elicitación con extractos de hoja de *Moringa oleifera*
Study of the induction of resistance in cellular suspensions of pepper (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) by elicitation with extracts of *Moringa oleifera* leaf

Estudo da indución de resistencia en suspensións celulares de pemento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) mediante a elicitación con extractos de folla de *Moringa oleifera*

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Dra. María de los Ángeles Bernal Pita da Veiga y Dr. Néstor Carrillo Barral, en calidad de tutores de este trabajo, autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Máster "Estudio de la inducción de resistencia en suspensiones celulares de pimiento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) mediante la elicitación con extractos de hoja de *Moringa oleifera*", presentado por Javier López do Campo para su defensa ante el Tribunal Evaluador.

En A Coruña, a 4 de Febrero del 2019.

Fdo.: Ángeles Bernal Pita da Veiga

Fdo.: Néstor Carrillo Barral

Firmado digitalmente
por BERNAL PITA DA
VEIGA MARIA DE LOS
ANGELES - 32758950G
Fecha: 2019.02.04
13:28:07 +01'00'

Firmado por CARRILLO
BARRAL, NESTOR (FIRMA)
Fecha: 04/02/2019 13:17:54
CET

Índice

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introducción | 1 |
| 1.1 | <i>Capsicum annuum</i> L..... | 1 |
| 1.2 | Cultivo <i>in vitro</i> | 2 |
| 1.2.1 | Callos..... | 2 |
| 1.2.2 | Suspensiones celulares | 3 |
| 1.3 | Resistencia inducida | 4 |
| 1.3.1 | <i>CaBPR1</i> y <i>CaSC1</i> | 5 |
| 1.3.2 | Elicitación | 5 |
| 1.4 | Metabolismo secundario..... | 6 |
| 1.4.1 | Compuestos fenólicos..... | 7 |
| 1.4.2 | Capacidad antioxidante..... | 7 |
| 1.5 | <i>Moringa oleifera</i> Lam..... | 9 |
| 2 | Objetivos..... | 11 |
| 3 | Material y Métodos..... | 12 |
| 3.1 | Cultivo <i>in vitro</i> | 12 |
| 3.1.1 | Plantas <i>in vitro</i> | 12 |
| 3.1.2 | Inducción de callos y repicado | 12 |
| 3.1.3 | Inicio de suspensiones celulares..... | 13 |
| 3.2 | Obtención de los extractos de <i>Moringa</i> | 14 |
| 3.3 | Elicitación de las suspensiones celulares | 14 |
| 3.3.1 | Inicio de suspensiones para elicitar | 14 |
| 3.3.2 | Elicitación | 15 |
| 3.3.3 | Recogida y machacado de las muestras..... | 15 |
| 3.4 | Determinación del contenido en fenoles totales..... | 16 |
| 3.5 | Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo DPPH..... | 16 |
| 3.5.1 | Recta patrón Trolox | 17 |
| 3.6 | Expresión génica..... | 17 |
| 3.6.1 | Extracción del RNA y síntesis del cDNA | 17 |
| 3.6.2 | PCR en tiempo real..... | 18 |
| 3.7 | Análisis estadístico | 19 |
| 4 | Resultados y discusión | 20 |
| 4.1 | Obtención de suspensiones celulares | 20 |
| 4.2 | Determinación del contenido fenólico | 22 |
| 4.3 | Determinación de la capacidad antioxidante | 24 |
| 4.4 | Expresión génica..... | 26 |
| 5 | Conclusiones/ Conclusions | 29 |
| 6 | Bibliografía..... | 30 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Planta y fruto de <i>Capsicum annuum</i> | 1 |
| Figura 2: Estructura química del Fenol | 7 |
| Figura 3: Principio del ensayo de capacidad antioxidante con DPPH | 8 |
| Figura 4: Molécula de Trolox..... | 9 |
| Figura 5: Planta y hojas de <i>Moringa oleifera</i> | 9 |
| Figura 6: Frasco de plantas <i>in vitro</i> , antes y después de la germinación..... | 20 |
| Figura 7: Plantas <i>in vitro</i> germinadas en la cámara de cultivo..... | 20 |
| Figura 8: Inducción de callos a partir de cotiledones de plantas <i>in vitro</i> | 21 |
| Figura 9: Callos desarrollados. | 21 |
| Figura 10: Suspensiones celulares en distintos estados de pardeamiento..... | 21 |
| Figura 11: Contenido fenólico de las suspensiones celulares con extracto de etanol al 80% | 22 |
| Figura 12: Contenido fenólico de las suspensiones celulares con extracto de agua destilada | 23 |
| Figura 13: Capacidad antioxidante de las suspensiones celulares con extracto de etanol 80% | 24 |
| Figura 14: Capacidad antioxidante de las suspensiones celulares con extracto de agua destilada | 25 |
| Figura 15: Expresión génica de <i>CaBPR1</i> y <i>CaSC1</i> en las suspensiones celulares con extracto de etanol 80% a las 6h y 24 h de elicitar | 26 |
| Figura 16: Expresión génica de <i>CaBPR1</i> y <i>CaSC1</i> en las suspensiones celulares con extracto de agua destilada a las 6h y 24 h de elicitar..... | 27 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Composición del medio de cultivo de plantas <i>in vitro</i> | 12 |
| Tabla 2: Composición del medio de cultivo de callos. | 13 |
| Tabla 3: Composición del medio de cultivo de las suspensiones. | 13 |
| Tabla 4: Cebadores empleados en el estudio mediante PCR en tiempo real. | 18 |
| Tabla 5: Contenido en fenoles totales del medio extracelular de las suspensiones elicidadas | 22 |

Resumen

En el presente trabajo se realizó un estudio de la inducción de resistencia en suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* al ser elicitadas con extractos de *Moringa oleifera*. Para ello, se iniciaron suspensiones de pimiento a partir de plantas *in vitro* y se elicitaron con dos extractos de *Moringa* para posteriormente determinar el contenido fenólico mediante el método Folin-Ciocalteu, la actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH y la expresión de dos genes de defensa, *CaBPR1* y *CaSC1*, mediante PCR en tiempo real. Los resultados indican un aumento del contenido fenólico, una mayor capacidad antioxidante y un efecto inductor de la expresión de los genes de defensa.

Abstract

The present work deals with the study of the defense induction in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* cell suspensions elicited with *Moringa oleifera* extracts. For this, pepper suspensions were started from vitroplants and elicited with two *Moringa* extracts to later determine the phenolic content by the Folin-Ciocalteu method, the antioxidant activity by the DPPH assay and the expression of two defense genes, *CaBPR1* and *CaSC1*, by means of real-time PCR. The results indicate an increase of the phenolic content, a greater antioxidant capacity and an induction of the expression of the defense genes.

Resumo

No presente traballo realízouse un estudo da indución de defensa en suspensións celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* ó ser elicitadas con extractos de *Moringa oleifera*. Para iso, iniciáronse suspensións de pemento a partir de plantas *in vitro* e se elicitaron con dous extractos de *Moringa* para posteriormente determinar o contido fenólico mediante o método Folin-Ciocalteu, a actividade antioxidante mediante o ensaio de DPPH e a expresión de dous xenes de defensa, *CaBPR1* e *CaSC1*, mediante PCR en tempo real. Os resultados indican un aumento do contido fenólico, una maior capacidade antioxidante e un efecto inductor da expresión dos xenes de defensa.

Palabras clave

Capsicum annuum, *Moringa oleifera*, elicitación, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, expresión génica, *CaBPR1*, *CaSC1*.

Key words

Capsicum annuum, *Moringa oleifera*, elicitation, phenolic compounds, antioxidant activity, gene expression, *CaBPR1*, *CaSC1*.

1 Introducción

1.1 *Capsicum annuum* L.

Capsicum annuum L., comúnmente denominado pimiento, es una especie perteneciente a la familia Solanaceae y al género *Capsicum*, que comprende 40 especies de las cuales sólo cuatro son ampliamente cultivadas: *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. pubescens* Ruiz & Pav. y *C. baccatum* L. (Khan *et al.*, 2014). Son plantas muy ramificadas, anuales o perennes, con hojas enteras y pecioladas; flores solitarias, generalmente blancas; fruto en baya, muy variable en tamaño, forma, color y sabor. Otra característica distintiva, que presentan algunos pimientos, es su sabor picante, debido al contenido en aminas, principalmente capsaicina (Muñoz Garmendia y Navarro, 1998).



Figura 1: Planta y fruto de *Capsicum annuum* (Corantus, 2019; Heirloom & Perennial, 2019).

El pimiento es uno de los cultivos vegetales más importantes, cultivándose en las regiones templadas, subtropicales y tropicales de Asia, África, América y los países mediterráneos. Esto se debe al alto valor nutricional de su fruto y a sus usos en la gastronomía y en los productos alimenticios de diferentes países, debido a su sabor, color y aromas distintivos. El fruto del pimiento es rico en carotenoides, proteínas, grasas, vitaminas y provitaminas, fibra alimentaria y minerales, siendo un ingrediente fundamental de la dieta humana (Bargavi y Elumalai, 2010; Irikova *et al.*, 2011).

El pimiento no solo destaca por su alto valor dietético, sino que también tiene importancia farmacológica, presentando propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas, y pudiendo actuar como protector cardiovascular (Khan *et al.*, 2014).

Este conjunto de cualidades, confieren al pimiento un gran valor económico, nutricional y farmacológico, siendo de interés el estudio de técnicas que mejoren su cultivo y resistencia a enfermedades.

1.2 Cultivo *in vitro*

Los cultivos celulares y tisulares *in vitro* consisten en un conjunto de técnicas que se caracterizan por el uso de un medio de cultivo nutritivo y por preservar unas condiciones de asepsia controlada durante todo el desarrollo vegetal (Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

Las técnicas de cultivo *in vitro* son indispensables en la producción de plantas libres de enfermedades, para la rápida multiplicación de genotipos poco comunes, para la transformación del genoma de plantas y en la producción de metabolitos secundarios (Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

El cultivo *in vitro* ofrece una serie de ventajas respecto al cultivo tradicional, incluyendo la independencia geográfica, estacional y ambiental, la ininterrumpida producción sin afectar al rendimiento, la no necesidad de pesticidas y herbicidas y la menor duración de los ciclos de crecimiento. Por el contrario, el principal inconveniente del cultivo *in vitro* es el alto coste de la técnica, relacionado con el medio de cultivo, la electricidad y la mano de obra especializada (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002; Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

Las dos técnicas más empleadas en el cultivo *in vitro* son la organogénesis y la callogénesis. La organogénesis se refiere a la producción de órganos vegetales, como raíces o tallos, a partir de meristemos directamente o de células desdiferenciadas indirectamente. Por otro lado, la callogénesis es la formación de una masa amorfa de células como respuesta a la exposición de un explante a diferentes reguladores de crecimiento. Dicha masa amorfa de células recibe el nombre de callo y puede ser utilizado para la regeneración de zonas de la planta o para el escalado y producción de metabolitos en suspensiones celulares (Morales-Rubio *et al.*, 2016).

1.2.1 Callos

Como se ha dicho anteriormente, un callo es una masa amorfa de células, similar a un tejido tumoral, más o menos organizado, que generalmente surge sobre heridas de órganos y tejidos diferenciados. Su proceso de formación se conoce como inducción del callo y consiste en la desdiferenciación celular de la planta, sirviendo de material inicial cualquier tejido u órgano de la misma (raíz, tallo, hoja, flor...). La desdiferenciación otorga a las células un mayor potencial de crecimiento y división, junto a la capacidad de volver a diferenciarse para regenerar nuevos órganos y tejidos (Pierik y Ayerbe Mateo-Sagasta, 1990).

Dicha desdiferenciación, depende de la presencia de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo. Otros factores determinantes son el genotipo del explante, la composición del medio nutritivo y los parámetros físicos de crecimiento, como la luz o la temperatura (Pierik y Ayerbe Mateo-Sagasta, 1990).

1.2.2 Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio líquido en movimiento. Se inician mediante la incubación de fragmentos de callo friable en medios líquidos que están en movimiento continuo. Las suspensiones celulares son de gran importancia en la investigación con vegetales, permitiendo múltiples aplicaciones, como el estudio del ciclo celular, diversos estudios fisiológicos y bioquímicos, la formación de metabolitos secundarios o la embriogénesis somática (Roca y Mroginski, 1991).

Las suspensiones celulares son el mejor método para la producción de metabolitos activos, esencialmente productos naturales. La producción de metabolitos secundarios depende principalmente de la concentración óptima de nutrientes, siendo clave el medio de cultivo, la concentración salina y el tipo y concentración de reguladores del crecimiento (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002). Uno de los medios de cultivo más utilizado es el medio Murashige y Skoog (MS), que destaca por presentar altas concentraciones de sales y nitrógeno (Murashige y Skoog, 1962).

El uso de suspensiones celulares en la investigación con vegetales, y en este trabajo en particular, se debe a que proporcionan una fuente de células homogéneas que no está limitada por el crecimiento lento, por las enfermedades o por las variaciones estacionales, ambientales y de cultivares, como ocurre en las plantas *in vivo*. Una ventaja adicional que presentan las suspensiones celulares es que pueden ser rápida y uniformemente expuestas a elicitores exógenos, al tiempo que facilitan el estudio de las respuestas a nivel celular (García-Pérez *et al.*, 1998; Ferri *et al.*, 2018)

1.3 Resistencia inducida

Las plantas están expuestas a un continuo estrés biótico (hongos, bacterias, herbívoros...) y abiótico (luz, temperatura, nutrientes, agua...), por lo que tienen que responder y adaptarse a estas alteraciones para poder desarrollarse. La estrategia de defensa utilizada para responder al estrés externo y a los ataques de patógenos, comienza con cambios en la expresión génica, que dan como resultado la síntesis de nuevas proteínas específicas y en última instancia, cambios generales a nivel bioquímico en los diferentes componentes de la planta. La inducción de defensa en plantas, por parte del ser humano, es un mecanismo que se puede utilizar para prevenir enfermedades (Sarowar *et al.*, 2005).

La resistencia inducida se puede definir como la activación de la expresión de los mecanismos naturales de defensa de las plantas contra diversos agentes, provocada por patógenos que causan una reacción necrótica hipersensible, patógenos avirulentos o por elicitores (Mishra *et al.*, 2012). La resistencia inducida puede expresarse localmente, cuando afecta a los sitios de infección o de elicitación, o sistémicamente, cuando el efecto se manifiesta de forma general en la planta (Vasyukova y Ozeretskoykaya, 2007).

La respuesta local incluye cambios a nivel de las defensas estructurales, como modificaciones en la pared celular, y cambios a nivel bioquímico, como la producción *de novo* de fitoalexinas y proteínas PR. Esta respuesta local genera una señal que se propaga a través de la planta, activando la respuesta sistémica (Heil y Bostock, 2002; Vasyukova y Ozeretskoykaya, 2007).

La resistencia inducida se puede dividir en dos categorías, la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR). La SAR es efectiva contra un amplio espectro de patógenos, especialmente biotrofos y hemibiotrofos, y está asociada con niveles aumentados de ácido salicílico y con la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). La ISR, efectiva contra patógenos necrotrofos, se suele inducir como resultado de la colonización de las raíces de las plantas por ciertas cepas de rizobacterias y hongos promotores del crecimiento (PGPR y PGPF) y está mediada por el ácido jasmónico y el etileno (Walters y Fountaine, 2009; Oliveira *et al.*, 2016).

El desarrollo de inductores de resistencia inducida contra enfermedades, se establece como una alternativa al control de plagas tradicional, particularmente en los casos en los que las medidas actuales son poco efectivas. Al mismo tiempo, permite la reducción del uso de pesticidas, que representan una de las principales preocupaciones con respecto a la preservación del medioambiente (Oliveira *et al.*, 2016).

1.3.1 CaBPR1 y CaSC1

Este trabajo estudia la expresión de dos genes en concreto, *CaBPR1* y *CaSC1*, que codifican para una proteína PR1 y una sesquiterpeno ciclasa respectivamente (García *et al.*, 2017).

El gen *CaBPR1* codifica para la proteína básica 1 relacionada con la patogénesis (PR). La mayoría de las proteínas de defensa inducibles en plantas son proteínas PR (pathogenesis related), y son inducidas y acumuladas como resultado de la infección de un patógeno o de condiciones de estrés abiótico. La inducción de las proteínas PR funciona como un mecanismo de defensa y su sobreexpresión mejora la resistencia a un gran número de patógenos. La proteína PR1, pertenece al grupo dominante de proteínas PR y se usa comúnmente como marcador de resistencia sistémica adquirida (SAR) (Sarowar *et al.*, 2005).

El gen *CaSC1* codifica para la sesquiterpeno ciclasa, que es una enzima que participa en la ruta general de los isoprenoides, en la síntesis de la fitoalexina capsidiol (Back *et al.*, 1998). La síntesis y acumulación de fitoalexinas es una de las respuestas de las plantas más estudiadas, tanto para el estrés abiótico como para el ataque de patógenos, estando su presencia asociada a la elicitación o infección por patógenos (Yin *et al.*, 1997).

1.3.2 Elicitación

El término elicitor se refiere a sustancias químicas de diversas fuentes, bióticas o abióticas, así como a factores físicos, que pueden desencadenar una respuesta en organismos vivos, dando como resultado la acumulación de metabolitos secundarios (Vasconsuelo y Boland, 2007).

En general, los elicitores químicos se clasifican según su origen y estructura molecular. Los elicitores pueden ser bióticos o abióticos y de acuerdo con sus características pueden inducir respuestas específicas que dependen de la interacción entre el elicitor y el cultivo celular (Liu *et al.*, 2019).

La intensidad de la respuesta varía según la concentración del elicitor y del tiempo de elicitación, siendo de gran importancia determinar empíricamente las condiciones óptimas para cada cultivo. Comúnmente, la literatura sostiene que el momento más adecuado para agregar el elicitor es durante la fase exponencial de crecimiento, cuando la maquinaria enzimática se encuentra en su máxima actividad (Vasconsuelo y Boland, 2007).

Un aspecto fundamental, en el que se basa la mayor parte de este trabajo, es el papel de los elicitores como inductores de resistencia. Algunos elicitores, al ser reconocidos por las plantas, activan una batería de mecanismos de defensa, incluidos los genes de resistencia que se encuentran reprimidos. Estos genes codifican para la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) como quitinasas y glucanasas, o enzimas que actúan en la lignificación de la pared celular o la producción de fitoalexinas (Oliveira *et al.*, 2016).

La elicitación de células vegetales en cultivo *in vitro*, también representa una herramienta biotecnológica muy útil para mejorar la producción de metabolitos secundarios, existiendo evidencia de que un mismo elicitor puede estimular diferentes cultivos celulares y, por otro lado, que ciertos cultivos de plantas responden a diversos elicitores (Vasconsuelo y Boland, 2007). Debido a esto, el estudio de la elicitación puede aumentar la productividad agrícola, no solo reduciendo las pérdidas causadas por los patógenos, sino también aumentando el crecimiento vegetativo (Oliveira *et al.*, 2016).

La elicitación se presenta como una de las principales alternativas en la mejora de la resistencia inducida y en la producción de metabolitos secundarios, pero también permite la manipulación de rutas metabólicas vinculadas a la inducción de estrés, sirviendo como fuente de estudio para caracterizar los factores de estrés (Narayani y Srivastava, 2017).

1.4 Metabolismo secundario

Todos los organismos invierten la mayor parte del carbono y energía en la síntesis de moléculas fundamentales (aminoácidos, nucleótidos, glúcidos...), necesarias para el funcionamiento del metabolismo primario. Las plantas, a diferencia de la gran mayoría de los organismos, también destinan una cantidad significativa de carbono y energía en la síntesis de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en el metabolismo primario, los llamados metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios tienen una gran variedad de funciones ecológicas para las plantas y un significativo valor medicinal y económico para el ser humano. Se agrupan principalmente en cuatro grupos: terpenos, glicósidos, alcaloides y compuestos fenólicos (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

1.4.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo químicamente heterogéneo de metabolitos secundarios que se caracterizan por presentar siempre un grupo fenol en su estructura, es decir, un anillo aromático que posee al menos un radical hidroxilo. Estos compuestos desempeñan diversas funciones en la planta, sirviendo como defensa frente a herbívoros o patógenos, funcionando como soporte mecánico, atrayendo polinizadores y dispersadores de frutos, absorbiendo las radiaciones ultravioleta o reduciendo el crecimiento de plantas competidoras (Taiz y Zeiger, 2006).

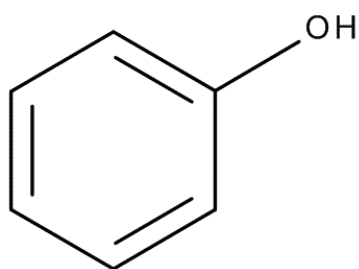


Figura 2: Estructura química del Fenol (Soviquim, 2018).

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de reciente interés comercial y médico, ya que son una parte esencial de la dieta humana y un foco de atención por sus propiedades antioxidantes. Estas propiedades antioxidantes previenen el daño tisular por radicales libres, evitando su formación, eliminándolos y promoviendo su descomposición (Peña-Cerda *et al.*, 2017).

Estudios epidemiológicos recientes han sugerido que las dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con una mayor esperanza de vida y también se ha encontrado que exhiben muchas propiedades relacionadas con la salud, incluyendo actividades antioxidantes, anticancerígenas, antivirales y antiinflamatorias, efectos sobre la fragilidad capilar y la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria (Siddhuraju y Becker, 2003).

1.4.2 Capacidad antioxidante

Como resultado del metabolismo de las plantas se produce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el ion superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroperoxil ($HO_2\cdot$) o el ion hidroxilo (OH^-). Las ROS se forman en los distintos compartimentos celulares, principalmente en los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas, y provocan daños en el ADN, la modificación de proteínas, la inactivación de enzimas y la oxidación de lípidos (Kasote *et al.*, 2015).

Para prevenir estos daños celulares, las plantas poseen dos sistemas de defensa contra las especies reactivas de oxígeno. Por un lado, poseen un sistema enzimático formado por la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa y, por otro lado, poseen unos sistemas no enzimáticos constituidos por moléculas de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, el glutatión, la prolina, los compuestos fenólicos o los flavonoides, generalmente denominados como antioxidantes (Kasote *et al.*, 2015).

De forma general, el término antioxidante se define como cualquier sustancia que a bajas concentraciones, retrasa y previene la oxidación de un sustrato. Los antioxidantes se dividen en dos grupos principales según su mecanismo de acción, los antioxidantes preventivos, que impiden la formación de las ROS y los antioxidantes secuestrantes que son los responsables de la eliminación de estas especies activas (Denev *et al.*, 2012).

La mayoría de los antioxidantes que consumimos en la dieta, como los compuestos fenólicos, los carotenoides y las vitaminas, provienen de vegetales, frutas y cereales. Debido a esto, el consumo de plantas se asocia a un menor riesgo de padecer enfermedades degenerativas, cardiovasculares y cáncer (Denev *et al.*, 2012).

La detección de la capacidad antioxidante de las muestras se va a llevar a cabo a partir del ensayo de DPPH, basado en la determinación espectrofotométrica de la decoloración de la solución de un compuesto cromógeno oxidado en presencia de antioxidantes. Este ensayo consiste en la cuantificación de la actividad antioxidante determinada por el descenso de la absorbancia a 515 nm de una solución metanólica de radical difenil 1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia de muestra, usando la solución del radical DPPH como absorbancia inicial. A mayor capacidad antioxidante del extracto, habrá una mayor pérdida de color, proporcional al grado de captura del radical oxidado (Teixeira *et al.*, 2013).

Para este ensayo se ha utilizado como estándar antioxidante, el Trolox, que es un fenol simple análogo de la vitamina E (Figura 4).

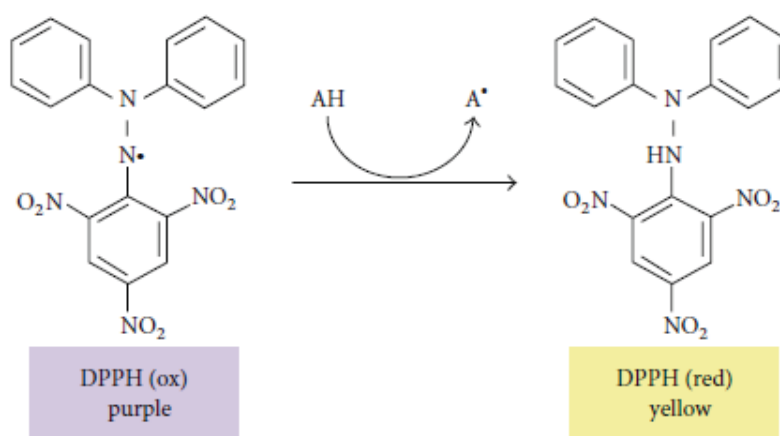


Figura 3: Principio del ensayo de capacidad antioxidante con DPPH (Teixeira *et al.*, 2013).

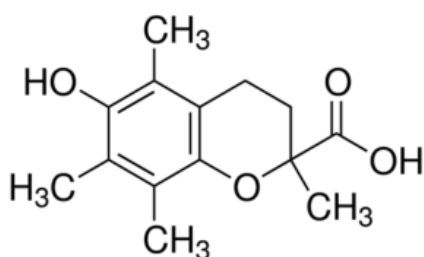


Figura 4: Molécula de Trolox (Sigma-Aldrich, 2018).

1.5 *Moringa oleifera* Lam.

El género *Moringa*, perteneciente a la familia Moringaceae, comprende 13 especies distribuidas en el sudoeste de Asia, suroeste de África, noreste de África y Madagascar, siendo *Moringa oleifera* Lam., nativa de la India, la especie más estudiada del género (Abd Rani *et al.*, 2018).



Figura 5: Planta y hojas de *Moringa oleifera*.

Moringa oleifera está considerado como uno de los árboles más útiles del mundo, ya que prácticamente la totalidad de la planta se puede usar como alimento o tiene alguna propiedad beneficiosa, siendo excepcionalmente nutritiva y poseyendo una gran variedad de usos potenciales (Emmanuel *et al.*, 2011b).

M. oleifera se encuentra silvestre y cultivada en muchos países de los trópicos y subtrópicos. Su composición consta de un amplio perfil de minerales, proteínas, vitaminas, β caroteno, aminoácidos y diversos compuestos fenólicos, siendo en conjunto una buena fuente de antioxidantes naturales (Mona, 2013). El extracto de sus hojas contiene una elevada concentración de citoquininas, zeatina y otras hormonas vegetales como las auxinas (Brockman y Brennan, 2017).

Las semillas de *Moringa* se usan para purificar el agua, las hojas como suplementos nutricionales, el aceite como biocombustible, los troncos como goma, y en general, todas las partes de la planta pueden usarse con fines nutricionales o medicinales (Abd Rani *et al.*, 2018). A partir de la semilla procesada de *Moringa* se pueden preparar fertilizantes orgánicos que aumentan la aeración del suelo y la riqueza de invertebrados beneficiosos para el suelo (Emmanuel *et al.*, 2011a).

También destaca por su valor medicinal, ya que actúa como estimulante cardíaco y circulatorio y posee capacidades antitumorales, antiinflamatorias, antioxidantes y antibacterianas, entre otras, siendo un árbol empleado tradicionalmente en la medicina indígena (Mona, 2013).

Otro aspecto de interés es que tanto la producción como el manejo de la *Moringa* es relativamente sencillo, ya que presenta una baja demanda de nutrientes y agua y se propaga con facilidad tanto sexual como asexualmente (Emmanuel *et al.*, 2011a).

Tanto sus cualidades nutricionales y medicinales como su fácil producción y manejo, han determinado que la *Moringa* sea el elicitor empleado en este trabajo.

2 Objetivos

En este trabajo se estudiará la capacidad elicitora de extractos de hoja de *Moringa oleifera* Lam. sobre suspensiones celulares de pimiento, analizando tanto el medio extracelular como las células.

Los principales objetivos de este trabajo serán:

- Inicio de una línea celular de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* para obtener suspensiones celulares y elicitación de las mismas con dos tipos de extracto de *Moringa oleifera*, empleando etanol al 80% y agua destilada respectivamente.
- Análisis de la respuesta de las suspensiones a nivel extracelular mediante el estudio del metabolismo secundario: compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.
- Análisis de la respuesta de las suspensiones a nivel celular mediante el análisis de la expresión génica: expresión de los genes *CaBPR1* y *CaSC1* mediante PCR en tiempo real.
- Comprobar el potencial de los extractos de *Moringa* como inductores de resistencia en suspensiones celulares.

3 Material y Métodos

3.1 Cultivo *in vitro*

3.1.1 Plantas *in vitro*

El cultivo *in vitro* se inició con el crecimiento de plantas *in vitro* a partir de semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. en condiciones de esterilidad, obtenidas del invernadero de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña. En primer lugar se envolvieron las semillas de pimiento y se esterilizaron mediante un lavado de 2 minutos en etanol al 70% y un posterior lavado de 20 minutos en hipoclorito sódico al 20%, manteniendo una agitación continua durante los lavados.

Se llevaron las semillas a la cabina de flujo laminar, previamente esterilizada por ultravioleta, y se realizaron 3 lavados consecutivos con agua destilada para eliminar los posibles restos de etanol e hipoclorito sódico. Tras los lavados con agua, se extrajeron las semillas de la gasa y se colocaron separadas en papel de filtro, dejándolas secar durante 1 hora. Posteriormente se colocaron circularmente en un frasco con medio de cultivo sólido sin hormonas (Tabla 1) y finalmente se cerró el frasco con parafilm y se introdujo en la cámara de cultivo (16h de luz/8h de oscuridad, 25°C).

| Productos | Concentración |
|---------------------------------|---------------|
| Sales Murashige y Skoog | 4,406 g/L |
| Vitamina de Morel | 1 mL/L |
| Caseína | 250 mg/L |
| Sacarosa | 30 g/L |
| Agar | 8 g/L |
| *Se fijó el pH del medio en 5,8 | |

Tabla 1: Composición del medio de cultivo de plantas *in vitro*.

3.1.2 Inducción de callos y repicado

La inducción de callos se llevó a cabo a partir de las plantas *in vitro* de *C. annuum*, en condiciones de esterilidad, trabajando en la cabina de flujo laminar. En primer lugar se tomó una planta de pimiento y se realizaron cortes longitudinales de sus cotiledones y cortes transversales del tallo. A continuación se depositaron los trozos circularmente en las placas Petri con el medio de cultivo sólido con hormonas (Tabla 2). Los trozos de cotiledón se colocaron con el envés en contacto con el medio. Finalmente se sellaron las placas con parafilm y se mantuvieron en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 1 mes.

| Productos | Concentración |
|---------------------------------|----------------------|
| Sales Murashige y Skoog | 4,406 g/L |
| Vitamina de Morel | 1 mL/L |
| Caseína | 250 mg/L |
| Sacarosa | 30 g/L |
| Ácido 2,4-diclorofenoxiacético | 3 mg/L |
| Kinetina | 0,05 mg/L |
| Agar | 8 g/L |
| *Se fijó el pH del medio en 5,8 | |

Tabla 2: Composición del medio de cultivo de callos.

Tras el crecimiento de los callos se realizó su repicado partiendo de las placas inducidas, donde se retiró el tejido vegetal y se extrajo el callo, que se colocó en el centro de una nueva placa. Para facilitar el crecimiento del callo se debe extender y presionar levemente para que quede en completo contacto con el medio. Se realizaron todas las placas posibles y se sellaron con parafilm, para ser conservadas en oscuridad y a temperatura ambiente hasta su desarrollo. Se realizó un control semanal de los callos para, en caso de crecimiento excesivo, volverlos a repicar a nuevas placas. Este repicado se realizó tomando las partes blandas del callo y colocándolo en el centro de una nueva placa.

3.1.3 Inicio de suspensiones celulares

El inicio de las suspensiones celulares se realizó en la cabina de flujo laminar, previamente esterilizada, a partir de los callos en crecimiento. Se seleccionaron las partes blanquecinas y blandas de los callos y se tomó un matraz de 100 mL, donde se pesaron 10 g por cada suspensión celular. Seguidamente se añadieron 40 mL de medio líquido con hormonas (Tabla 3), se agitó para dispersar los callos en la suspensión y finalmente se llevó a la cámara de cultivo. Las suspensiones celulares se mantuvieron en oscuridad a 25°C y en agitación continua, mediante una placa agitadora.

| Productos | Concentración |
|---------------------------------|----------------------|
| Sales Murashige y Skoog | 4,406 g/L |
| Vitamina de Morel | 1 mL/L |
| Caseína | 250 mg/L |
| Sacarosa | 30 g/L |
| Ácido 2,4-diclorofenoxiacético | 3 mg/L |
| Kinetina | 0,05 mg/L |
| *Se fijó el pH del medio en 5,8 | |

Tabla 3: Composición del medio de cultivo de las suspensiones.

Las suspensiones celulares se revisaron semanalmente, en caso de haber una elevada concentración celular se realizó una dilución 1:1 de la suspensión y se dividió en dos matraces. Las suspensiones que pardearon o adquirieron colores indeseados fueron descartadas.

3.2 Obtención de los extractos de *Moringa*

Las hojas de *Moringa oleifera* Lam. se tomaron de plantas cultivadas en el invernadero de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña. Posteriormente se sometieron a un proceso de deshidratación en la estufa a 70°C durante 72 horas. El material vegetal seco se trituró, usando un mortero, hasta obtener un polvo homogéneo de *Moringa*. A partir de este polvo de *Moringa* se llevaron a cabo dos extracciones diferentes, obteniendo un primer extracto con etanol al 80% y un segundo extracto con agua destilada.

Para el primer extracto, se pesaron 50 mg de polvo de *Moringa* a los que se le añadió 2,5 mL de etanol al 80%. A continuación se calentó la muestra en un termobloque a 50°C durante 15 min. Pasado este tiempo se dejó enfriar durante 5 min en agua y finalmente se filtró a través de papel de laboratorio, quedando el filtrado como extracto final.

Para el segundo extracto, se pesaron 50 mg de polvo de *Moringa* a los que se le añadió 2,5 mL de agua destilada. A continuación se calentó la muestra en un termobloque a 100°C durante 15 min. Pasado este tiempo se dejó enfriar durante 5 min en agua, se filtró a través de papel de laboratorio y se hizo pasar el extracto por un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro, con la finalidad de esterilizarlo.

Para cada uno de los experimentos, se preparó el extracto independientemente y el mismo día de la elicitación.

3.3 Elicitación de las suspensiones celulares

3.3.1 Inicio de suspensiones para elicitar

Partiendo de suspensiones celulares saturadas, y trabajando en la cabina de flujo laminar previamente esterilizada, se iniciaron las suspensiones experimentales. En primer lugar, se hizo pasar por un colador la suspensión saturada, desechando el medio extracelular y conservando la masa celular. Se presionaron ligeramente las células con la intención de eliminar el mayor contenido extracelular y posteriormente se pesaron 3 g en un matraz Erlenmeyer, al cual se añadieron 20 mL de medio de cultivo líquido.

Este proceso se repitió hasta tener un total de 4 matraces por experimento (Control 6h, Control 24h, *Moringa* 6h, *Moringa* 24h). Finalmente, los matraces se guardaron en oscuridad a 25°C con agitación continua, hasta que se realizó la elicitación.

3.3.2 Elicitación

La elicitación se llevó a cabo 24h después del inicio de las suspensiones celulares, en la cabina de flujo laminar, previamente esterilizada. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado para cada uno de los extractos.

La elicitación del extracto etanólico consistió en añadir 100 µL de etanol al 80% en cada uno de los controles (Control 6h, Control 24h) y 100 µL del extracto de *Moringa* con etanol en cada uno de los matraces tratados (*Moringa* 6h, *Moringa* 24h).

La elicitación del extracto acuoso consistió en añadir 100 µL de agua destilada en cada uno de los controles (Control 6h, Control 24h) y 100 µL del extracto de *Moringa* con agua en cada uno de los matraces tratados (*Moringa* 6h, *Moringa* 24h).

Todas las suspensiones celulares fueron incubadas en las mismas condiciones, en la cámara de cultivo a 25°C, con agitación continua y oscuridad.

3.3.3 Recogida y machacado de las muestras

La recogida de muestras se realizó en la cabina de flujo laminar a las 6h y a las 24h tras la elicitación. Se filtraron los matraces correspondientes usando una bomba de vacío y se guardaron las muestras de células y de medio extracelular de forma independiente, en tubos de 50 mL. Se pesaron dichos tubos vacíos y con las células, para tener el dato de materia celular recogida.

Los tubos con células se enfriaron rápidamente utilizando nitrógeno líquido y se conservaron en un congelador a -80°C, hasta el momento de su machacado. Por otro lado, los tubos con medio extracelular se guardaron en un congelador a -20°C.

Las muestras celulares se trituraron utilizando un mortero, manteniéndolas congeladas durante todo el proceso. El machacado obtenido, se dividió en dos tubos eppendorf con aproximadamente 0,5 g de muestra cada uno. Los eppendorf se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta el momento de la extracción de RNA.

3.4 Determinación del contenido en fenoles totales

Método de Folin-Ciocalteu y recta de calibrado de ácido gálico

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó con el reactivo de Folin-Ciocalteu, según el método modificado que reduce el consumo de reactivos (Kraujalytė *et al.*, 2015).

La recta de calibrado se realizó con 5 concentraciones distintas de ácido gálico (0,01 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,10 mg/mL y 0,20 mg/mL) a partir de las cuales se tomaron 100 μ L por triplicado y se añadió 1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 10 veces. Tras 4 minutos de incubación en oscuridad, se añadió a cada tubo 1 mL de Na₂CO₃ al 7% y 400 μ L de agua destilada, volviendo a incubar los tubos durante 90 minutos en oscuridad. Tras la incubación, se procedió a la lectura de la absorbancia a 760 nm, utilizando como blanco un tubo con 100 μ L de agua destilada en lugar de ácido gálico.

$$\text{Absorbancia}_{760\text{nm}} = 3,7224 \cdot [\text{equivalentes de ácido gálico}] + 0,0599$$
$$R^2 = 0,9850$$

La cuantificación del contenido fenólico de las muestras de medio extracelular se realizó con el mismo procedimiento que el empleado en la elaboración de la recta de calibrado, con la sustitución del ácido gálico por 100 μ L de cada muestra correspondiente. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por mililitro de medio extracelular (μ g GAE/ mL ME) y gráficamente en porcentaje relativo al control.

3.5 Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo DPPH

La actividad antioxidante se determinó por el descenso de la absorbancia a 515 nm de una solución metanólica de radical difenil 1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia de las distintas muestras, en donde la absorbancia de la solución del radical DPPH es la absorbancia inicial (A_0) (Thaipong *et al.*, 2006). El DPPH con el radical oxidado presenta un color inicial morado que a medida que se va reduciendo se torna amarillo. Esta diferencia de color permite cuantificar el porcentaje de DPPH reducido mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{reducido}} = ((A_0 - A_m)/A_0) \cdot 100, \text{ siendo } A_m \text{ la absorbancia de la muestra}$$

Preparamos una solución de DPPH 1mM (40 mg de DPPH en 100 mL de metanol absoluto), que se diluyó con metanol absoluto hasta llegar a valores de absorbancia cercanos a 0,800. Las medidas de absorbancia se realizaron a 515 nm, utilizando metanol absoluto como blanco y haciendo reaccionar, directamente en la cubeta y sin tiempo de incubación, 50 μ L del estándar antioxidante con 950 μ L de DPPH.

3.5.1 Recta patrón Trolox

Preparamos una solución madre de Trolox 1 mM en etanol absoluto (25 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico en 100 mL de etanol) y a partir de ella se prepararon 5 disoluciones a diferentes concentraciones (10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM y 300 µM). Medimos la absorbancia inicial (A0) y las absorbancias de las 5 concentraciones por triplicado a 515 nm, tomando 50 µL de cada concentración y 950 µL de DPPH.

$$\% \text{ DPPH}_{\text{reducido}} = 0,084 \cdot [\text{equivalentes de Trolox}] - 3,4596$$
$$R^2 = 0,9440$$

La capacidad antioxidante se expresó en base a los equivalentes de Trolox obtenidos, y gráficamente como el porcentaje relativo a cada control.

3.6 Expresión génica

3.6.1 Extracción del RNA y síntesis del cDNA

La extracción de RNA se realizó mediante el protocolo de extracción y purificación de RNA para muestras difíciles del E.Z.N.A[®] Plant RNA Kit (OMEGA bio-tek). Este procedimiento emplea columnas de afinidad para retener el RNA de forma específica e incluye el uso previo de un buffer de lisis para facilitar el tratamiento de la muestra.

Tras la extracción del RNA, se realizó una cuantificación espectrofotométrica a 260 y 280 nm, añadiendo 4 µL de muestra purificada en 996 µL de agua destilada, usando esta como blanco. El valor de absorbancia a 260nm refleja la concentración de RNA, mientras que la ratio 260/280 indica su calidad y pureza. El objetivo de esta cuantificación fue comprobar que la extracción se había realizado correctamente, observando si hay la suficiente concentración de RNA para la síntesis del cDNA.

La síntesis del DNA complementario (cDNA) se llevó a cabo con el iScript[™] cDNA Synthesis Kit de BIO RAD, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El procedimiento se basa en la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), formándose el cDNA a partir del RNA por la acción de la transcriptasa inversa.

3.6.2 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es una técnica que recopila datos al tiempo que la PCR se produce, combinándose la amplificación del DNA y su detección en un único paso. Esto se debe al uso de fluoróforos que sirven para correlacionar la concentración del producto de PCR con la intensidad de fluorescencia. La cantidad de DNA se determina por el ciclo de PCR donde se detecta por primera vez la amplificación, denominado umbral de ciclo (C_t), que corresponde con el tiempo en el que la intensidad de fluorescencia es mayor que la fluorescencia de fondo (Wong y Medrano, 2005).

La PCR en tiempo real fue realizada la Dra. M.^a Fernanda Rodríguez Fariña de la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo a Investigación de la UDC (SAI), empleando el cDNA sintetizado previamente y un Biorad iCycleTMiQ System. Se analizó la expresión de los genes de una proteína PR1 (*CaBPR1*) y una sesquiterpeno ciclasa (*CaSC1*), utilizando como gen de referencia el gen de la actina (*CaACT*). Los cebadores empleados para la amplificación se indican en la Tabla 4.

| Gen | Nº acceso | Ref. | Nombre | Secuencia | Amplicón |
|---------------|-----------|-------------------------------|---------|---------------------------------|----------|
| <i>CaBPR1</i> | AF053343 | (Gayoso <i>et al.</i> , 2007) | PR1Fw | 5'GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT3' | 301 pb |
| | | | PR1Rv | 5'CAAGCAATTATTTAAAGATCCA3' | |
| <i>CaSC1</i> | AF061285 | (Silvar <i>et al.</i> , 2008) | CaSCFW | 5'GCCTCCTGCTTCTGAATACC3' | 312 pb |
| | | | CaSCRv | 5'TTAATATCCTTCCATCCCGACT3 | |
| <i>CaACT</i> | AY572427 | (Silvar <i>et al.</i> , 2008) | CaACTFw | 5'ATCCCTCCACCTCTTCACTCTC3' | 128 pb |
| | | | CaACTRv | 5'GCCTTAACCATTCCCTGTTCCATTATC3' | |

Tabla 4: Cebadores empleados en el estudio mediante PCR en tiempo real.

La PCR constó de una primera etapa de desnaturalización del cDNA, durante 2 minutos a 95°C, posteriormente de 40 ciclos de amplificación, con 20 segundos a 95°C, 25 segundos a 58°C y 50 segundos a 72°C cada uno, y seguido de un paso final de 5 minutos a 72°C.

La expresión génica se determinó mediante la cuantificación relativa de los genes de interés en comparación al gen de referencia. La ratio de expresión relativa de cada gen se calculó en base a su eficiencia (E) y a la desviación del umbral de ciclo (Ct) entre cada muestra y su respectivo control, y expresado en relación al gen de referencia (Pfaffl, 2001).

$$\text{ratio de expresión génica} = \frac{(E_{\text{diana}})^{\Delta C_t \text{ diana (Control-muestra)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_t \text{ ref (Control-muestra)}}$$

Los resultados se obtuvieron en base a la fórmula anterior y se expresaron relativizando a su respectivo control.

3.7 Análisis estadístico

Los ensayos de contenido fenólico y capacidad antioxidante se realizaron por cuadruplicado, mientras que el estudio de la expresión génica se realizó por triplicado. Los datos se expresaron con su respectivo error típico de la media, que se halló mediante un análisis de la desviación estándar. Las regresiones lineales y las representaciones gráficas se llevaron a cabo mediante el programa Microsoft Office Excel 2013. El análisis estadístico se basó en el método no paramétrico de Kruskal-Wallis, debido a la ausencia de normalidad de los resultados. El estudio estadístico se realizó empleando el programa StatGraphics y considerando un nivel de significación de $\alpha < 0,05$.

4 Resultados y discusión

4.1 Obtención de suspensiones celulares

La obtención de plantas *in vitro* duró entre 10 y 15 días, desde el momento de implantación de las semillas en el medio de cultivo hasta el desarrollo de las plántulas. El proceso de esterilización, constituido por los lavados en etanol al 70% e hipoclorito sódico al 20% resultó ser óptimo, ya que no apareció ningún tipo de contaminación, ni afectó a la viabilidad de las semillas. Por otro lado, el medio de cultivo permitió el desarrollo de prácticamente la totalidad de las semillas.



Figura 6: Frasco de plantas *in vitro*, antes y después de la germinación.



Figura 7: Plantas *in vitro* germinadas en la cámara de cultivo.

A partir de las plantas *in vitro* se indujo la formación de los callos, partiendo de los cotiledones y el tallo. En este caso, el medio de cultivo presentaba hormonas que serían necesarias para la dediferenciación del tejido vegetal. La formación del callo fue un proceso más lento, tardando entre 12 y 15 días en apreciarse la primera masa de células dediferenciadas y en torno a un mes, para el desarrollo completo del callo. Esta primera masa de callos, se utilizó para repicar en nuevas placas con medio de cultivo sólido, tardando un mes en desarrollarse desde el inicio del repicado.



Figura 8: Inducción de callos a partir de cotiledones de plantas in vitro.



Figura 9: Callos desarrollados.

Finalmente se dio inicio a las suspensiones celulares, partiendo de los callos desarrollados y medio de cultivo líquido. Este proceso resultó ser el más crítico, por la sensibilidad de las suspensiones celulares, descartando inicialmente varios matraces que obtenían colores pardeados y conservando las que se desarrollaban correctamente. Tras varias series de diluciones, se obtuvo un número constante de 10 suspensiones celulares, que se revisaron semanalmente, conservando siempre las 5 que se encontraban en mejor estado y diluyéndolas nuevamente.



Figura 10: Suspensiones celulares en distintos estados de pardeamiento.

La optimización del diseño experimental para la obtención de suspensiones celulares se realizó partiendo de trabajos anteriores, donde se consiguieron resultados similares (Codesal García, 2016). El correcto desarrollo de las suspensiones permitió su uso en las posteriores determinaciones, siendo la base experimental de los siguientes estudios.

4.2 Determinación del contenido fenólico

Al determinar el contenido de compuestos fenólicos totales en ambos extractos, se observó una tendencia general de aumento del contenido fenólico en las suspensiones elicidadas con *Moringa* frente a sus respectivos controles. Este aumento diverge en los dos tipos de extractos empleados durante la elicitación y en las horas de recogida (Tabla 5).

| | Control | <i>Moringa</i> |
|--------------------------------|----------------|-----------------------|
| Ext. Etanol 80% 6h | 14,086 ± 2,301 | 25,570 ± 10,733 |
| Ext. Etanol 80% 24h | 12,022 ± 5,799 | 25,593 ± 6,119 |
| Ext. Agua destilada 6h | 5,399 ± 2,634 | 12,116 ± 1,719 |
| Ext. Agua destilada 24h | 11,914 ± 2,671 | 15,944 ± 2,617 |

Tabla 5: Contenido en fenoles totales del medio extracelular de las suspensiones elicidadas. Los datos representan la media en μg de GAE/ mL ME de 4 experimentos \pm el error estándar.

La cuantificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo en el medio extracelular, con la idea de estudiar el papel del apoplasto como primera barrera entre la planta y un posible patógeno. En este aspecto, los compuestos fenólicos extracelulares intervienen en las interacciones con elicitores o patógenos, en la formación de la pared celular y en la actividad antioxidante (Baker *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2011).

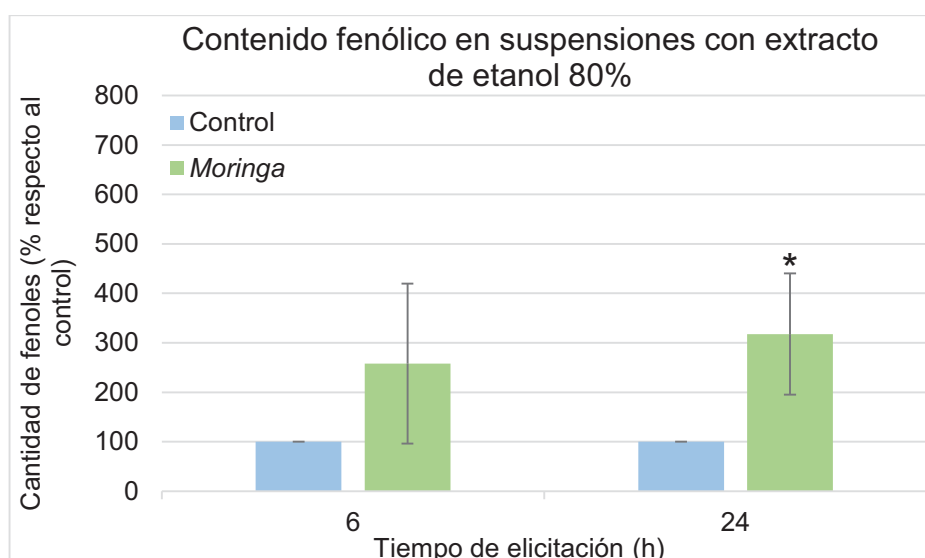


Figura 11: Contenido fenólico de las suspensiones celulares con extracto de etanol al 80%, representado por el porcentaje de fenoles en comparación al control. Los datos representan la media de 4 experimentos \pm el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas.

En las suspensiones elicidadas con el extracto de etanol al 80%, se observó un incremento fenólico a las 6h de elicitación, sin ser estadísticamente significativo, posiblemente por la gran variabilidad de los resultados entre los experimentos. En cambio, a las 24 horas, sí que resultó ser significativo el aumento del contenido fenólico de la suspensión elicitada con *Moringa* frente al control (Figura 11).

En las suspensiones celulares con el extracto de agua destilada, se observó un incremento significativo del contenido fenólico tanto a las 6 horas, como a las 24 horas (Figura 12), por lo que se puede asumir que hay síntesis y liberación de compuestos fenólicos en comparación a los controles sin *Moringa*.

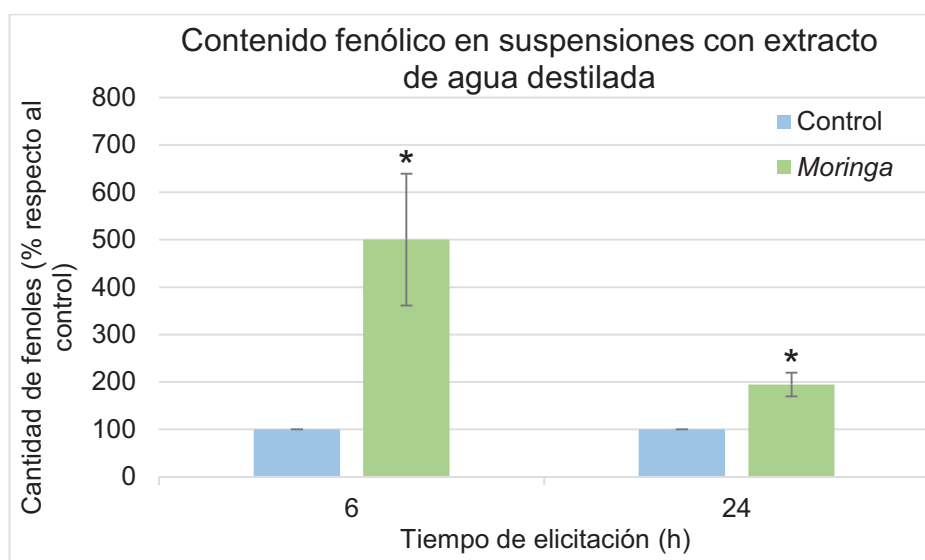


Figura 12: Contenido fenólico de las suspensiones celulares con extracto de agua destilada, representado por el porcentaje de fenoles en comparación al control. Los datos representan la media de 4 experimentos \pm el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas.

Al analizar los resultados entre los dos extractos, no se encontraron diferencias importantes entre ellos, pero sí se observó una tendencia de mayor contenido fenólico en las suspensiones celulares con el extracto de etanol al 80%. Es posible que el etanol al 80% favorezca la extracción de determinados compuestos de la *Moringa*, que inducen la síntesis y liberación de fenoles en las suspensiones celulares.

El aumento del contenido fenólico en las suspensiones elicidadas con extracto de *Moringa*, indica que la *Moringa* induce la formación y la liberación de compuestos fenólicos. Este aumento del contenido fenólico, concuerda con trabajos anteriores, donde se empleó el extracto de *Moringa* como elicitor de suspensiones (Verde Yañez, 2017; Fernández Vázquez, 2018). También se comprobó el potencial uso del extracto de hojas de *Moringa* para la mejora de la producción de compuestos fenólicos en cultivos *in vivo* de rúcula (Mona, 2013), de espinaca (Aslan *et al.*, 2016) y de rábano (Ashraf *et al.*, 2018).

En base a los resultados obtenidos en suspensiones celulares de pimiento y de acuerdo a investigaciones en diferentes cultivos vegetales, posiblemente el extracto de *Moringa* pueda aumentar la producción de fenoles en los cultivos *in vivo* de pimiento, aunque sería necesario realizar un estudio al respecto.

4.3 Determinación de la capacidad antioxidante

Los resultados obtenidos en la capacidad antioxidante de las suspensiones celulares, fueron distintos según el método empleado para obtener el extracto de *Moringa* con que se realizó la elicitación.

En las suspensiones celulares elicidadas con el extracto de etanol al 80% se obtuvo un ligero descenso de la capacidad antioxidante a las 6 horas y un leve aumento de esta actividad a las 24 horas, ambos resultados sin significación estadística (Figura 13).

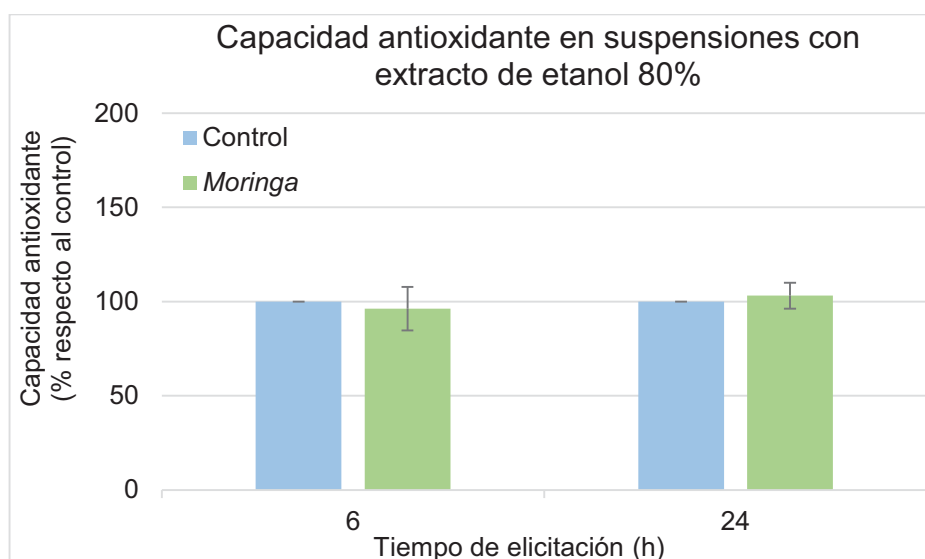


Figura 13: Capacidad antioxidante de las suspensiones celulares con extracto de etanol 80%, representado por el porcentaje respecto al control. Los datos representan la media de 4 experimentos \pm el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas.

En las suspensiones celulares elicidadas con extracto de agua destilada se obtuvo un aumento significativo de la capacidad antioxidante del extracto de *Moringa* respecto a su control, tanto a las 6 horas como a las 24 horas (Figura 14).

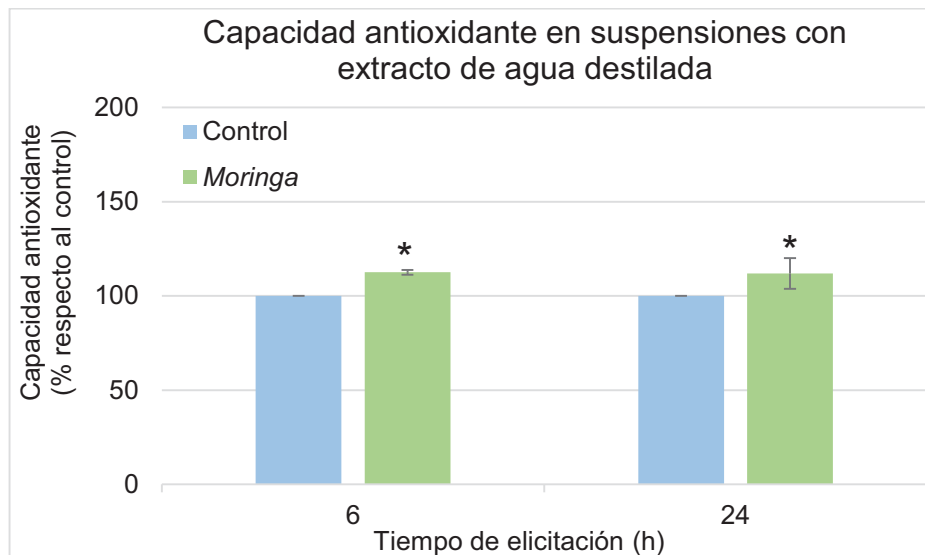


Figura 14: Capacidad antioxidante de las suspensiones celulares con extracto de agua destilada, representado por el porcentaje respecto al control. Los datos representan la media de 3 experimentos \pm el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas.

Los resultados obtenidos en las suspensiones elicidadas con extracto de etanol al 80%, reflejan que la extracción etanólica de la *Moringa* no libera compuestos que, al elicitar en las suspensiones, aumenten su actividad antioxidante. No se observó, por tanto, concordancia entre los resultados de contenido fenólico y de capacidad antioxidante en las suspensiones elicidadas con extracto de etanol. Esto podría deberse a que, a pesar de aumentar el contenido fenólico y por tanto de la actividad antioxidante, el extracto etanólico de *Moringa* produce algún tipo de estrés que induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como método de defensa. La producción de ROS está asociada a una respuesta basal típica de las plantas y se observó en otros estudios con elicitors de origen vegetal (Pangallo *et al.*, 2016).

En las suspensiones celulares elicidadas con extracto de agua destilada, sí se observó el efecto inductor de la capacidad antioxidante del extracto de *Moringa*, tanto a las 6 horas como a las 24 horas. Este aumento de la capacidad antioxidante puede estar relacionado con el mayor contenido fenólico, observándose esta concordancia en varias investigaciones con cultivos de pimiento (Biswas *et al.*, 2011; Tundis *et al.*, 2011) y en otros cultivos, como la avena (Emmons *et al.*, 1999). El aumento de la capacidad antioxidante mediante la elicitación con extractos de hojas de *Moringa*, fue observado anteriormente en varias investigaciones con cultivos *in vivo*. Se comprobó el potencial uso del extracto de *Moringa* para la mejora de la actividad antioxidante en cultivos de rúcula (Mona, 2013), de espinaca (Aslan *et al.*, 2016) y de rábano (Ashraf *et al.*, 2018). Otro aspecto clarificador es que, tanto en el presente estudio como en los citados antes, la extracción de las hojas de *Moringa* se llevó a cabo mediante agua destilada.

Los resultados obtenidos en suspensiones celulares de pimiento, puede ser el punto de partida para posteriores estudios con cultivos *in vivo*, donde se compruebe la posible mejora de la capacidad antioxidante por parte de los extractos de *Moringa*.

4.4 Expresión génica

Los resultados obtenidos reflejaron, en términos generales, un aumento significativo de la expresión génica a las 6 horas tras la elicitación y un descenso de dicha expresión, transcurridas las 24 horas.

En las suspensiones celulares con el extracto de etanol al 80% se observó un comportamiento similar en ambos genes. El gen *CaBPR1* aumentó significativamente su expresión a las 6 horas, mientras que sufrió un descenso significativo a las 24 horas. En el caso del gen *CaSC1*, se dio la misma respuesta, aumento significativo a las 6 horas y descenso significativo a las 24 horas (Figura 15).

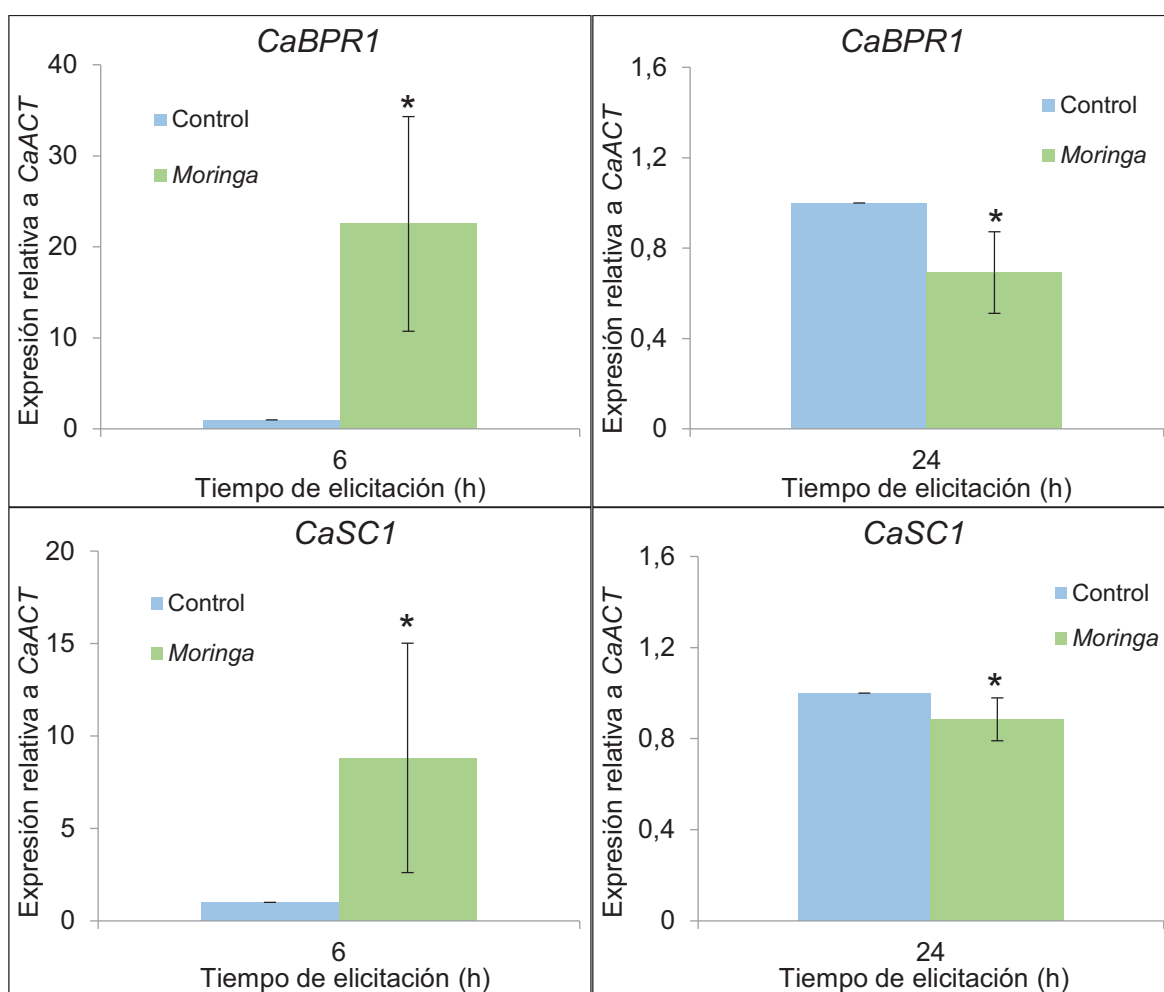


Figura 15: Expresión génica de *CaBPR1* y *CaSC1* en las suspensiones celulares con extracto de etanol 80% a las 6h y 24 h de elicitar. Los datos representan la media de 3 experimentos \pm el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas.

La elicitación con extracto de agua destilada, resultó ser pareja a la del extracto de etanol al 80%. La expresión génica del gen *CaBPR1* se vio aumentada significativamente a las 6 horas de la elicitación y sufrió un descenso a las 24 horas. En el gen *CaSC1* se observó el aumento significativo a las 6 horas, mientras que a las 24 horas se obtuvo un resultado que diverge con los anteriores, al no haber cambios visibles (Figura 16).

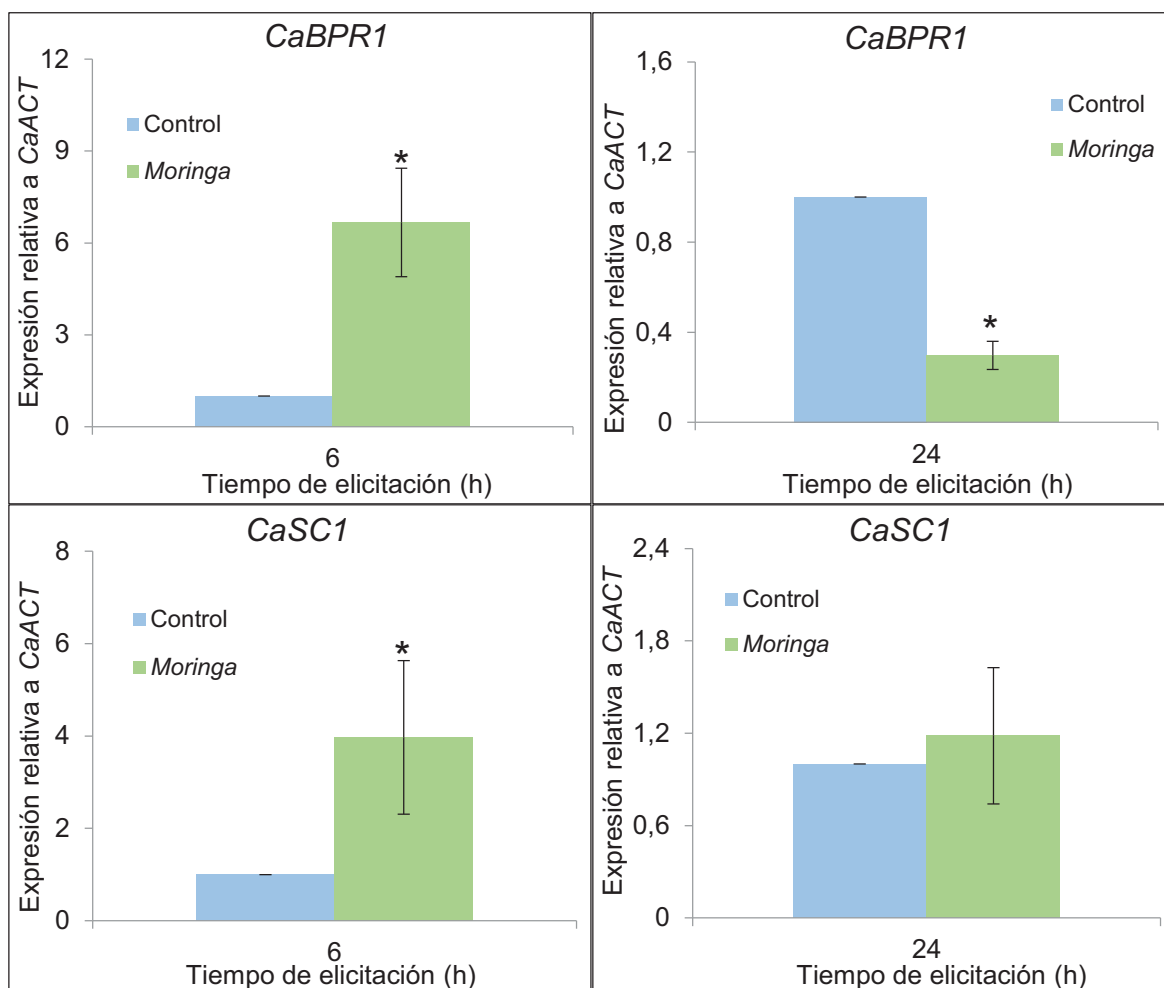


Figura 16: Expresión génica de *CaBPR1* y *CaSC1* en las suspensiones celulares con extracto de agua destilada a las 6h y 24 h de elicitar. Los datos representan la media de 3 experimentos \pm el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas.

El aumento de la expresión génica en las suspensiones de pimiento elicidadas con extractos de *Moringa*, observado a las 6 horas, indicó el potencial de la *Moringa* como inductor de resistencia. Este aumento de la expresión fue visible, tanto para la extracción de la *Moringa* con etanol al 80% como con agua destilada. Los resultados fueron similares para *CaBPR1* y *CaSC1* a las 6 horas, indicando que la elicitación con extracto de *Moringa* induce una respuesta instantánea en ambos genes, activando su expresión al poco tiempo de elicitar las suspensiones. Esta inducción de resistencia en suspensiones celulares puede ser el punto de partida para futuras investigaciones con cultivo *in vivo* de pimiento, con la idea de comprobar si los extractos de *Moringa* pueden ser una alternativa real en la defensa de los cultivos.

Por el contrario, tras las 24 horas de la elicitación, el extracto de *Moringa* provocó un descenso de esta expresión génica respecto al control, resultando extraño en comparación a lo visto a las 6 horas. En estudios con plantas *in vivo*, utilizando otros elicitores, al producirse la inducción de los genes de interés, el comportamiento observado es el aumento de dicha expresión hasta llegar a un máximo, a partir del cual disminuye paulatinamente pero sin sobrepasar los valores de partida (Veloso y Díaz, 2011; Wang *et al.*, 2013).

La sobreexpresión dada a las 6 horas pudo haber producido una inhibición de la expresión, aunque la reducida bibliografía sobre expresión génica en suspensiones celulares no clarifica lo que pudo haber ocurrido a las 24 horas tras la elicitación, dando pie a futuros estudios sobre expresión génica en suspensiones celulares.

En términos generales, tanto el extracto etanólico como el acuoso, pese a contener compuestos diferentes, tienen la capacidad de provocar una respuesta defensiva en las suspensiones de pimiento. Esto se aprecia tanto a nivel génico a las 6 horas, como en el contenido fenólico y en la capacidad antioxidante. Los extractos de *Moringa* son unos buenos candidatos para ser utilizados en la inducción de resistencia, pero esto ha de ser probado en estudios donde se trabaje con plantas completas, y en los que se analice su capacidad real para defenderse ante el ataque de patógenos.

5 Conclusiones/ Conclusions

Conclusiones

- Se inició una línea celular de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* para obtener suspensiones celulares a partir de plantas *in vitro*, lo cual constituyó la base experimental de este estudio.
- El extracto de *Moringa* favorece la formación y liberación de compuestos fenólicos, siendo significativo en el extracto de etanol a las 24 horas y en el extracto de agua destilada a las 6 y 24 horas. El análisis de la capacidad antioxidante varió según el extracto empleado, mostrando un aumento de la actividad antioxidante al elicitar con el extracto acuoso de *Moringa oleifera*.
- En cuanto al análisis de la expresión génica, se confirmó el efecto inductor de defensa de ambos extractos de *Moringa*. El aumento de la expresión de los genes de defensa, *CaBPR1* y *CaSC1*, fue significativamente visible a las 6 horas de la elicitación. Por el contrario, el extracto de *Moringa* produce un descenso de la expresión a las 24 horas.
- Los datos de expresión génica, en conjunto con los de fenoles y capacidad antioxidante, sugieren que los extractos de *Moringa* tienen el potencial de inducir resistencia en cultivos celulares de pimiento.

Conclusions

- A cell line of *Capsicum annuum* L. var. *annuum* was initiated to obtain cell suspensions from vitroplants, which formed the experimental basis of this study.
- *Moringa* extracts favors the formation and liberation of phenolic compounds, being significant in the ethanol extract at 24 hours and in the distilled water extract at 6 and 24 hours. The analysis of antioxidant capacity varied according to the extract used, showing an increase in antioxidant activity when elicited with the aqueous extract of *Moringa oleifera*.
- Regarding the analysis of gene expression, the defense-inducing effect of both *Moringa* extracts was confirmed. The increase in the expression of the defense genes, *CaBPR1* and *CaSC1*, was significantly visible at 6 hours after elicitation. On the other hand, *Moringa* extracts produces a decrease in expression at 24 hours.
- The data of gene expression, together with those of phenols and antioxidant capacity, suggest that *Moringa* extracts have the potential to induce resistance in pepper cell cultures.

6 Bibliografía

- Abd Rani, N., Husain, K., Kumolosasi, E. (2018). *Moringa* genus: A review of phytochemistry and pharmacology. *Front Pharmacol*, 9.
- Ashraf, R., Sultana, B., Riaz, S., Mushtaq, M., Iqbal, M., Nazir, A., Atif, M., Zafar, Z. (2018). Fortification of phenolics, antioxidant activities and biochemical attributes of radish root by plant leaf extract seed priming. *Biocatal Agric Biotechnol*, 16: 115-120.
- Aslan, M., Sultana, B., Anwar, F., Munir, H. (2016). Foliar spray of selected plant growth regulators affected the biochemical y antioxidant attributes of spinach in a field experiment. *Turk J Agric For*, 40: 136-145.
- Ávalos García, A., Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3): 119-145.
- Back, K., He, S., Kim, K., Shin, D. (1998). Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiol.*, 39(9): 899-904.
- Baker, C., Whitaker, B., Roberts, D., Mock, N., Rice, C., Deahl, K., Aver'yanov, A. (2005). Induction of redox sensitive extracellular phenolics during plant–bacterial interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 66(3): 90-98.
- Bargavi, R., Elumalai, S. (2010). Chilli (*Capsicum annuum*) cultivation, diseases, breeding, advanced techniques in biotechnology- general review. *Biosci Biotechnol Res Asia*, 7(1): 171-178.
- Biswas, A., Bhattacharya, A., Chattopadhyay, A., Chakravarty, A., Pal, S. (2011). Antioxidants and antioxidant activity in green pungent peppers. *Int. J. Veg. Sci.*, 17(3): 224-232.
- Brockman, H., Brennan, R. (2017). The effect of foliar application of *Moringa* leaf extract on biomass, grain yield of wheat and applied nutrient efficiency. *J Plant Nutr*, 40(19): 2728-2736.
- Cai, Z., Kastell, A., Mewis, I., Knorr, D., Smetanska, I. (2011). Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 108(3): 401-409.
- Codesal García, V. Diseño experimental para la obtención de suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* [trabajo de fin de grado]. A Coruña: Universidade da Coruña; 2016. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2183/17326> [acceso 1 de febrero de 2019].
- Corantus (2019). Pimiento - Corantus. [online] Available at: <https://corantus.com/pimiento> [Accessed 16 Jan. 2019].
- Denev, P., Kratchanov, C., Ciz, M., Lojek, A., Kratchanova, M. (2012). Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols: *in vitro* and *in vivo* evidences and possible mechanisms of action: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 11(5): 471-489.
- Emmanuel, S., Emmanuel, B., Zaku, S., Thomas, S. (2011a). Biodiversity and agricultural productivity enhancement in Nigeria: application of processed *Moringa oleifera* seeds for improved organic farming. *Agric. biol. j. N. Am.*, 2(5): 867-871.
- Emmanuel, S., Zaku, S., Adedirin, S., Tafida, M., Thomas, S. (2011b). *Moringa oleifera* seed-cake, alternative biodegradable and biocompatibility organic fertilizer for modern farming. *Agric. biol. j. N. Am.*, 2(9): 1289-1292.
- Emmons, C., Peterson, D., Paul, G. (1999). Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. *In vitro* antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 47(12): 4894-4898.
- Espinosa-Leal, C., Puente-Garza, C., García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1): 1-18.
- Fernández Vázquez, A. Estudo da capacidade antioxidante do medio extracelular de suspensións elicidadas cun estrato de follas de *Moringa oleifera* [trabajo de fin de grado]. A Coruña: Universidade da Coruña; 2018. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2183/21258> [acceso 1 de febrero de 2019].
- Ferri, M., Guarín, N., Barbieri, F., Tassoni, A. (2018). *Capsicum spp in vitro* liquid cell suspensions: A useful system for the production of capsaicinoids and polyphenols. *Plant Biosyst.*, 152(3): 436-444.

- García, T., Veloso, J., Díaz, J. (2017). Properties of vanillyl nonanoate for protection of pepper plants against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 150(4): 1091-1101.
- García-Pérez, M., Egea, C., Candela, M. (1998). Defence response of pepper (*Capsicum annuum*) suspension cells to *Phytophthora capsici*. *Physiol Plant*, 103(4): 527-533.
- Gayoso, C., de Ilárduya, O., Pomar, F., Merino de Cáceres, F. (2007). Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.*, 118(3): 199-209.
- Heil, M., Bostock, R. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann. Bot.*, 89(5): 503-512.
- Heirloom & Perennial (2019). *Capsicum annuum*, chili pepper - jalapeno. [Internet] Disponible en: <https://www.foodforests.eu/products/capsicum-annuum-chili-pepper-jalapeno-untreated> [Acceso 16 de enero de 2019].
- Irikova, T., Grozeva, S., Rodeva, V. (2011). Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*. *Acta Physiol. Plant.*, 33(5): 1559-1570.
- Kasote, D., Katyare, S., Hegde, M., Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *Int. J. Biol. Sci.*, 11(8): 982-991.
- Khan, F., Mahmood, T., Ali, M., Saeed, A., Maalik, A. (2014). Pharmacological importance of an ethnobotanical plant: *Capsicum annuum* L. *Nat. Prod. Res.*, 28(16): 1267-1274.
- Kraujalytė, V., Venskutonis, P., Pukalskas, A., Česonienė, L., Daubaras, R. (2015). Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chem*, 188: 583-590.
- Liu, H., Kang, Y., Zhao, X., Liu, Y., Zhang, X., Zhang, S. (2019). Effects of elicitation on bioactive compounds and biological activities of sprouts. *J Funct Foods*, 53: 136-145.
- Mishra, A., Sharma, K., Misra, R. (2012). Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *J Plant Interact*, 7(2): 95-120.
- Mona, M. (2013). The potential of *Moringa oleifera* extract as a biostimulant in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*) plants. *Int. J. Plant Physiol. Biochem.*, 5(3): 42-49.
- Morales-Rubio, M.E., Espinosa-Leal, C., Garza-Padrón, R.A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. En: Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A. y Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona: OmniaScience, pp. 351-410.
- Muñoz Garmendia, F., Navarro, C. (1998). Flora ibérica. Plantas vasculares de la península Ibérica e Islas Baleares. Vol.XI. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC, pp.163-166.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15(3): 473-497.
- Narayani, M., Srivastava, S. (2017). Elicitation: a stimulation of stress in *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochem Rev*, 16(6): 1227-1252.
- Oliveira, M., Varanda, C., Félix, M. (2016). Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochem Lett*, 15: 152-158.
- Pangallo, S., Li Destri Nicosia, M., Raphael, G., Levin, E., Ballistreri, G., Cacciola, S., Rapisarda, P., Droby, S., Schena, L. (2016). Elicitation of resistance responses in grapefruit and lemon fruits treated with a pomegranate peel extract. *Plant Pathol.*, 66(4): 633-640.
- Peña-Cerda, M., Arancibia-Radich, J., Valenzuela-Bustamante, P., Pérez-Arancibia, R., Barriga, A., Seguel, I., García, L., Delporte, C. (2017). Phenolic composition and antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz. leaves of different genotypes. *Food Chem*, 215: 219-227.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9): 2002-2007.
- Pierik, R., Ayerbe Mateo-Sagasta, L. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3ª ed. Madrid: Mundi-Prensa, pp. 209-222.

- Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 20(2): 101-153.
- Roca, W., Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. 1ª ed. Cali: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), pp.174-195.
- Sarowar, S., Kim, Y., Kim, E., Kim, K., Hwang, B., Islam, R., Shin, J. (2005). Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Rep.*, 24(4): 16-224.
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 51(8): 2144-2155.
- Sigma-Aldrich. (2018). Sigma-Aldrich. [Internet] Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/238813?lang=es®ion=ES> [Acceso 27 de diciembre de 2018].
- Silvar, C., Merino, F., Díaz, J. (2008). Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.*, 165(10): 1120-1124.
- Soviquim (2018). Fenol en cristales ACS 99. 500 Gr. - Soviquim. [Internet] Disponible en: <https://www.soviquim.cl/filtro-f/1252-fenol-en-cristales-acs-99-500-gr.html> [Acceso 27 de diciembre de 2018].
- Taiz, L., Zeiger, E. (2006). Plant physiology. 3ª ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, pp. 285-306.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E., Garrido, J., Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *Biomed Res Int*, 2013: 1-11.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*, 19(6-7): 669-675.
- Tundis, R., Loizzo, M., Menichini, F., Bonesi, M., Conforti, F., Statti, G., De Luca, D., de Cindio, B., Menichini, F. (2011). Comparative study on the chemical composition, antioxidant properties and hypoglycaemic activities of two *Capsicum annuum* L. cultivars (*acuminatum* small and *cerasiferum*). *Plant Foods Hum Nutr*, 66(3): 261-269.
- Vasconsuelo, A., Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.*, 172(5): 861-875.
- Vasyukova, N., Ozeretskovskaya, O. (2007). Induced plant resistance and salicylic acid: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 43(4): 367-373.
- Veloso, J., Díaz, J. (2011). *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defence genes. *Plant Pathol.*, 61(2): 281-288.
- Verde Yañez, L. Ensayo de elicitación de suspensiones celulares utilizando como elicitor un extracto de hojas de *Moringa oleifera* [trabajo de fin de grado]. A Coruña: Universidade da Coruña; 2017. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2183/19620> [acceso 1 de febrero de 2019].
- Walters, D., Fountaine, J. (2009). Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *J Agric Sci*, 147: 523-535.
- Wang, J., Li, D., Zhang, Y., Zhao, Q., He, Y., Gong, Z. (2013). Defence responses of pepper (*Capsicum annuum* L.) infected with incompatible and compatible strains of *Phytophthora capsici*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 136(3): 625-638.
- Wong, M., Medrano, J. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1): 75-85.
- Yin, S., Mei, L., Newman, J., Back, K., Chappell, J. (1997). Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression (characterization of an elicitor- and pathogen-inducible promoter). *Plant Pathol.*, 115(2): 437-451.