

## Memoria do Traballo de Fin de Máster

**Estudo da indución de resistencia en suspensións celulares de pemento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) mediante a elicitación cun extracto de alpechín.**

**Estudio de la inducción de resistencia en suspensiones celulares de pimiento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) mediante la elicitación con un extracto de alpechín.**

**Study of the induction of resistance in cellular suspensions of pepper (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) by elicitation with extracts of olive mill wastewater.**



**M<sup>a</sup> Ángeles Fernández Vázquez**

Setembro, 2019

*Tutora académica: Dra. María de los Ángeles Bernal Pita da Veiga*  
*Tutor académico: Dr. Néstor Carrillo Barral*

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 alpechin”, presentado por María Angeles Fernández Vázquez para su defensa ante el Tribunal Evaluador. En A Coruña, a 6 de Septiembre del 2019.

Fdo.: Ángeles Bernal Pita da Veiga

Fdo.: Néstor Carrillo Barral

## Financiación

---

Este Trabajo Fin de Máster forma parte del proyecto de investigación RTA2017-00019-C03-03: “Estrategias alternativas de control integrado frente a enfermedades causadas por hongos en cultivos hortícolas: respuesta de la planta y eficacia en pimiento (PIMBIOCON)”, financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

## ÍNDICE

1.	Introdución .....	2
1.1.	Cultivo <i>in vitro</i> .....	2
1.2.	Callo.....	2
1.3.	Suspensión celular .....	3
1.4.	Elicitación.....	3
1.5.	Metabolismo secundario .....	4
1.5.1.	Compostos fenólicos .....	4
1.5.2.	Antioxidantes .....	5
1.6.	Resistencia inducida.....	6
1.7.	<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>annuum</i> .....	8
1.8.	Alpechín .....	9
2.	Obxectivos.....	10
3.	Materiais e métodos .....	11
3.1.	Inicio dunha liña celular de <i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>Annuum</i> .....	11
3.1.1.	Medio de cultivo .....	11
3.1.2.	<i>Vitro plant</i> .....	12
3.1.3.	Indución e repicado de callos .....	12
3.1.4.	Inicio de suspensións celulares e repicado .....	13
3.2.	Elicitación das suspensións celulares.....	13
3.2.1.	Obtención de suspensión celulares para a elicitación. ....	13
3.2.2.	Elicitación das suspensión celulares .....	14
3.3.	Recollida de mostras .....	14
3.4.	Procesado das mostras celulares.....	14
3.5.	Contido total de fenoles e actividade antioxidante do medio celular e extracelular.....	14
3.5.1.	Extracción de fenoles e antioxidantes do medio celular.....	14
3.5.2.	Determinación do contido total de fenoles. ....	15
3.5.3.	Determinación da actividade antioxidante.....	15
3.6.	Expresión dos xenes <i>CaBPRI</i> , <i>CaSCI</i> e <i>CaPOI</i> .....	16
3.6.1.	Extracción de ARN.....	16
3.6.2.	Síntese de cDNA. ....	16
3.6.3.	PCR a tempo real .....	17
3.7.	Análise estatístico .....	18
4.	Resultados e discusión.....	18
4.1.	Obtención de <i>vitro plant</i> .....	18

<b>4.2.</b>	<b>Obtención e repicado de callos</b> .....	19
<b>4.3.</b>	<b>Obtención de suspensiones celulares</b> .....	19
<b>4.4.</b>	<b>Fenoles</b> .....	20
<b>4.5.</b>	<b>Capacidad antioxidante</b> .....	22
<b>4.6.</b>	<b>Expresión xénica</b> .....	26
<b>4.6.1.</b>	<b><i>CaBPR1</i></b> .....	26
<b>4.6.2.</b>	<b><i>CaSCI</i></b> .....	27
<b>4.6.3.</b>	<b><i>CaPO1</i></b> .....	28
<b>5.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	30
<b>6.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	31

## **Resumo**

No presente traballo realizouse un estudo da indución de defensa en suspensións celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* ó ser elicitadas cun extracto de alpechín. Para elo, iniciáronse suspensións de pemento a partir de plantas *in vitro* e se elicitaron cun extracto de alpechín para posteriormente determinar o contido fenólico mediante o método Folin-Ciocalteu, a actividade antioxidante mediante o ensaio de DPPH, no medio celular e no medio extracelular. Tamén se determina a expresión dos xenes de defensa *CaBPRI*, *CaSCI* e *CaPOI*, mediante PCR en tempo real. Os resultados indican un aumento do contido fenólico, una maior capacidade antioxidante tanto no medio celular como no medio extracelular e un efecto inductor da expresión dos xenes de defensa.

## **Palabras chave**

Cultivo *in vitro*, extracto alpechín, *Capsicum annuum*, compostos fenólicos, capacidade antioxidante, elicitor, expresión xénica, *CaBPRI*, *CaSCI*, *CaPOI*.

# 1. Introducción

## 1.1. Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* consiste nun conxunto de técnicas que permiten o crecemento dun explante (protoplasto, célula, tecido ou órgano) nun medio nutritivo de composición definida, en condicións de asepsia e factores ambientais controlados.

O cultivo *in vitro* de plantas ten factores importantes como son: o medio nutritivo e os factores ambientais. O medio nutritivo está composto de nutrientes, hormonas, vitaminas, auga e agar e a concentración de cada un varía conforme as necesidades da planta a cultivar. Por outra banda, é moi complexo reproducir todas as condicións ambientais que afectan a unha planta nun laboratorio, por elo reproducense aquelas que se poden controlar como a temperatura, a humidade ou as condicións de luz/escuridade.

A principios do século XX Haberlandt estableceu o cultivo *in vitro* e foi mellorando hasta que se converteu nunha ferramenta indispensable para a produción de plantas libres de enfermidades, para a multiplicación de xenotipos, para a transformación xenética de plantas e a produción de metabolitos (Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

O uso do cultivo *in vitro* para a obtención de metabolitos secundarios bioactivos converteuse nunha técnica novidosa e atractiva. Esta técnica ofrece unha serie de vantaxes como a subministración continúa do metabolito (independentemente de factores ambientais), non necesita de amplos espazos como o cultivo de planta no campo e obtéñense compostos naturais que por síntese química é moi complexo de obter. (Paolis *et al.*, 2019). Ademais existen diversas estratexias para aumentar a produción dos metabolitos como a optimización da taxa de crecemento e rendemento da planta ou o uso de elicitores, aos cales responden de forma rápida e homoxénea.

## 1.2. Callo

Existen diferentes formas de cultivo *in vitro*, un deles é o cultivo de callos. Un callo é una masa amorfa de células indiferenciadas. Estas estruturas obtéñense mediante calloxénese, que consiste en inocular explantes nun medio nutritivo sólido cunha determinada concentración de hormonas para que se produza a desdiferenciación celular. A calloxénese soe ser un dos primeiros pasos biotecnolóxicos que se pode usar para rexenerar plantas enteiras ou para o inicio de suspensións celulares.

### **1.3. Suspensión celular**

As suspensións celulares son agregados celulares ou células libres dispostas nun medio líquido en axitación. Para ter un bo crecemento celular é adecuado partir dun callo friable o cal se transfire a un medio líquido e se incuba en escuridade, a unha temperatura de 25°C e en axitación para romper os agregados celulares. Un callo friable é aquel que presenta un alto grado de división celular, reconécese por presentar cor branca e textura xelatinosa.

A suspensión celular inicial está normalmente composta por grandes agregados que teñen unha baixa taxa de división celular. A solución é realizar subcultivos cando a suspensión celular estea próxima ao punto de saturación, con elo conseguimos que os agregados se rompan e se estableza unha liña celular cun alto ritmo de crecemento.

As suspensións celulares teñen un maior potencial que o cultivo de tecidos e órganos da planta para as aplicacións industriais e investigacións (Schmidt-Durán *et al.*, 2016), xa que mediante elas pódese estudar o ciclo celular, aspectos fisiolóxicos e bioquímicos. Como se comentou anteriormente, o uso de elicitores en suspensións celulares presenta unha serie de vantaxes como a distribución homoxénea, grazas a axitación que provoca o contacto do elicitor con todas as células. Responden de maneira rápida aos elicitores debido a que as células presentan paredes finas. Por último é posible ampliar a produción dende os matracas de laboratorio a biorreactores de produción industrial.

### **1.4. Elicitación**

A elicitación é aplicar un axente a un cultivo vexetal, desencadeando un aumento na produción de metabolitos secundarios (habitualmente xéranse en baixas concentracións) ou mellora o seu rendemento (Narayani & Srivastava, 2017). Como consecuencia deste aumento do rendemento ou na produción de metabolitos secundarios, actívase ou increméntase o nivel de resistencia do cultivo vexetal.

Os elicitores pódense clasificar en bióticos (estratos de levadura, proteínas...) ou abióticos (pH, luz...) e dentro de estes últimos en físicos (temperatura...) ou químicos (metais pesados...).

O mecanismo de acción dos elicitores non está moi claro, pero sí se sabe que depende de diversos factores como o tipo de elicitor e a súa concentración, ou a etapa de crecemento do material vexetal no momento da elicitación (Saini *et al.*, 2014).



Os elicitores bióticos teñen vías de sinalización dependentes de ácido salicílico, dando lugar a resistencia sistemática adquirida (SAR) e como consecuencia acumúlanse proteínas relacionadas de patoxénese (PR). Na vía de sinalización dos elicitores abióticos están involucradas o ácido jasmónico e o etileno, dando lugar a resistencia sistémica inducida. (Vallad & Goodman, 2004).

## 1.5. Metabolismo secundario

### 1.5.1. Compostos fenólicos

Os fenoles son compostos bioactivos sintetizados a través do metabolismo secundario das plantas. Os flavonoides, os taninos ou os ácidos fenólicos son exemplos de fenoles. Estes compostos teñen un gran papel na fisioloxía e morfoloxía das plantas, xa que contribúen a defensa da planta contra un estrés abiótico ou biótico, proporcionando protección contra patóxenos e depredadores. Ademais, son responsables do sabor, color e sabor das froitas e verduras.

A estrutura básica dos fenóis é un anel aromático, o cal posúe un ou máis substituíntes hidroxilo (Varga *et al.*, 2018). A partir desta estrutura, os fenóis poden formar moléculas simples (Figura 1) ou polímeros complexos de alto peso molecular (Figura 2) (Balasundram *et al.*, 2006). Por outro lado, os fenóis poden encontrarse de forma libre pero xeralmente están unidos a un glúcido formando un glucósido, algo moi frecuente entre os flavonoides, ou a unha amida. Os fenoles tamén forman parte da parede celular, como por exemplo en ligninas e os ácidos hidroxicinámicos, os cales protexen contra o estrés como son as infeccións, as feridas ou a radiación ultravioleta (Khoddami *et al.*, 2013).

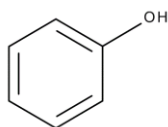


Figura 1: Estrutura química dun fenol simple (Soviqum, 2018).

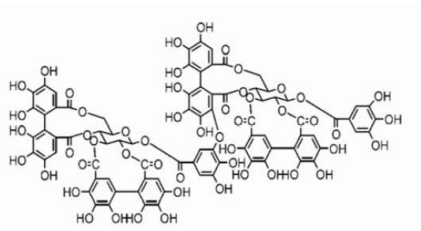


Figura 2: Estrutura química dun fenol complexo (Dai & Mumper, 2010).

Os fenóis teñen moitas actividades biolóxicas como anteriormente se mencionou, pero cabe destacar a súa actividade antioxidante, a cal depende da estrutura, das posicións e número dos grupos hidroxilo e as substitucións dos aneis aromáticos (Balasundram *et al.*, 2006). As súas propiedades antioxidantes residen na quelación de ións metálicos, inhibición da oxidación de lípidos, inhibición de enzimas formadoras de radicais e neutralizando os radicais libres (Kim *et al.*, 2003). Polo que os fenoles teñen un gran beneficio sobre a saúde ao combater este estrés oxidativo evitando así enfermidades do corazón, reduce a inflamación, diminúe a incidencia de cancro e a diabetes (Khoddami *et al.*, 2013). Ademais teñen efectos antialérxicos, antiarteroxénicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, cardioprotectores e vasodilatadores (Balasundram *et al.*, 2006).

Actualmente, o interese por antioxidantes naturais para substituír aos antioxidantes sintéticos, os cales están sendo restrinxidos pola súa carcinóxénese (Boutennoun *et al.*, 2017). Por todas estas razóns, ter unha dieta rica en froita e verdura ten grandes beneficios na saúde humana.

### 1.5.2. Antioxidantes

Os radicais libres defínense como moléculas que teñen na súa orbita máis externa un electrón desapareado ou libre, como consecuencia, estas moléculas teñen unha alta capacidade de reaccionar con outras moléculas, co fin de captar un electrón para ser estables. Estes radicais libres poden ser de tres tipos: especies reactivas de osíxeno (ROS) como o peróxido de hidróxeno ( $H_2O_2$ ) ou o superóxido ( $O_2^-$ ) sendo este tipo o máis habituais, especies reactivas de nitróxeno (RNS) como o óxido nítrico ( $NO^-$ ) e especies reactivas de xofre (RSS) (Kasote *et al.*, 2015).

O orixe dos radicais libres pode ser endóxena ou esóxena. As fontes endóxenas de radicais libres son os orgánulos subcelulares das células, sobre todo en mitocondrias e cloroplastos, así como a parede celular como un subproduto natural das reaccións

metabólicas onde está implicado o osíxeno e do que as células se deben protexer. Sen embargo, poden ser as propias células quen produzan os radicais libres, xa que actúan como moléculas de sinalización para loitar fronte a patóxenos. Tamén de forma esóxena como a contaminación, a radiación ou pesticidas.

A sobreproducción de radicais libres provoca un estrés oxidativo, o cal ten como consecuencia o dano de biomoléculas como o ADN, as proteínas e os lípidos. Este estrés oxidativo produce en plantas necrose, clorose, deformacións menor capacidade de asimilación de CO<sub>2</sub> e outros efectos negativos. O estrés oxidativo tamén ten consecuencias na saúde humana, dando lugar a problemas cardiovasculares, enfermidades neurodexenerativas, cancro, diabetes e outras enfermidades (Peña-Cerda *et al.*, 2017).

As células teñen sistemas de protección para tratar cos radicais libres. Estes sistemas poden ser enzimáticos e inclúen enzimas como a peroxidasa ou a catalasa, ou non enzimáticos, que inclúe moléculas como o ácido ascórbico, carotenoides ou ácidos fenólicos. Estes antioxidantes naturais teñen a capacidade de impedir a formación de radicais libres e de eliminalos grazas a que lles doan un dos seus electróns volvéndoos estables e terminando a reacción de captura de electróns.

Os antioxidantes poden ter orixe endóxena, como ocorre frecuentemente en plantas, que a través do seu metabolismo secundario, son capaces de sintetizar ditas moléculas. No caso dos animais, estes posúen sistemas enzimáticos e compostos antioxidante que se poden suplementar como antioxidantes de forma esóxena, é dicir, a través da dieta, a partir de nutrientes como as vitaminas ou os carotenoides, ou de non nutrientes como son os compostos fenólicos. Polo que a fonte principal de antioxidantes son de orixe vexetal e as fontes máis ricas son os cereais, as froitas e as verduras (Denev *et al.*, 2012).

### **1.6. Resistencia inducida**

As plantas encóntranse sometidas a estréss bióticos e/ou abióticos de forma continuada e como consecuencia deben defenderse ou adaptarse ao estrés. As plantas teñen defensas que expresan de forma constitutiva e inducibles. As defensas constitutivas exprésanse continuamente e xeralmente son defensas pasivas. Estas pódense clasificar en defensas estruturais como é a presenza de cutícula ou en defensas bioquímicas como son compostos tóxicos como as toxinas. As defensas da planta tamén se poden inducir

ou desenvolverse tras ser sometida a un estrés, o que se coñece como resistencia inducida. Para que se poidan activar as defensas, a planta ten que recoñecer o factor de estrés. Isto prodúcese a través dos DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*), PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) ou efectores. Unha vez recoñecido prodúcese unha transdución sinal que ten como resultado a indución das defensas da planta. Isto implica o reforzamento das defensas estruturais e bioquímicas. En moitos casos é necesario un proceso de síntese de novos compostos, o que implica unha regulación a nivel da expresión xénica.

Nas plantas, caracterizáronse dous tipos de resistencia inducida, a resistencia sistémica adquirida (SAR), a cal se activa como resposta ao ataque dun patóxeno e está regula por ácido salicílico e a resistencia sistémica inducida (ISR), activada por rizobacterias promotoras do crecemento da planta e está regulada polas fitohormonas ácido jasmónico e etileno.

A resistencia sistémica adquirida (SAR) é un mecanismo inducible que proporciona resistencia en zonas da planta non infectadas. Esta resistencia caracterízase por ser eficaz contra patóxenos que producen necrose como fungos, bacterias e virus e por ser unha resistencia duradeira que se mantén activa durante días ou semanas, polo que este tipo de resistencia é moi atractiva desde o punto de vista agronómico (Molina *et al.*, 2007).

Unha vez que se produce o recoñecemento dun patóxeno, da como resultado la activación da inmunidade activada por PAMP (PTI). Esta inmunidade pode inhibirse mediante efectores procedentes dos patóxenos. A planta recoñece ao efector e da lugar a activación da inmunidade activada por el efector (ETI) (Ádám *et al.*, 2018). Xeralmente, a ETI está ligada coa resposta hipersensible (HR).

A resposta hipersensible é unha reacción de defensa rápida que induce a produción de substancias tóxicas para os patóxenos como son os ROS e a indución da morte celular programada, con fin que o patóxeno (xeralmente briófitos) colonice toda a planta.

Na zona infectada da planta prodúcese sinais que se transporta a toda a planta, onde as partes non infectadas desenrolan resistencia a novas infeccións como a síntese de proteínas PR ou fitoalexinas, dando lugar a resistencia sistémica (Thakur & Sohal, 2013).

A variedade de estrés que sofre a planta ten como consecuencia perdida do seu rendimento. Os agricultores fan fronte a este problema usando plaguicidas ou funxicidas, principalmente. Inducir a resistencia sistémica adquirida (SAR) é unha alternativa máis respectuosa co medio ambiente. Polo que é interesante o estudo de elicitores capaces de inducir este tipo de resistencia

Neste traballo estúdase a expresión xénica de tres xenes implicados na resistencia inducida, a saber: *CaBPR1* (proteína básica relacionada coa patoxénese 1 en *Capsicum annuum*) , *CaSCI* (enzima sesquiterpeno ciclase de *Capsicum annuum*) e *CaPO1* (enzima peroxidasa de *Capsicum annuum*).

### **1.7. *Capsicum annuum* L. var. *annuum***

*Capsicum annuum* L., coñecido comunmente como pemento, pertence a familia Solanaceae. É unha planta herbácea anual ou perenne que pode acadar ós 150 cm de altura, con un talo principal que se ramifica dicotómicamente, do que parten as follas de forma alternada. As follas teñen un pecíolo longo, son lobuladas, enteiras e lisas (Reche, 2010). As flores son completas, actinomorfas, de cor branca e aparecen de forma solitaria. Os froitos, que teñen diferentes formas, color e sabor, conteñen as sementes, ovaladas e de cor amarelenta.



Figura 3: Planta e froito de *Capsicum annuum* L. var. *Annuum*

*Capsicum annuum* é nativo das zonas tropicais e húmidas de América Central e do Sur (Reche, 2010). O inicio da súa domesticación prodúcese entre os anos 7000 e 5000 a.c., polo que se trata dun dos cultivos máis antigos. En 1943 esta planta foi introducida en

España como ornamental grazas ós viaxes de Colón a América. Posteriormente, foise expandindo por Europa, Medio Oriente e Asia.

Actualmente, *Capsicum annuum* L. é unha das plantas máis cultivadas no mundo e goza dunha gran importancia económica (Reche, 2010), sendo o sétimo froito mais consumidas no mundo (Paes *et al.*, 2019).

O seu éxito radica tanto na cociña polo seu sabor e color característicos, por ser un froito altamente nutritivo como polas súas propiedades farmacolóxicas. As propiedades farmacolóxicas do pemento son debidas a que contén compostos activos como son os capsicinoides (capsicina) ou os compostos fenólicos (flavonoides), os cales actúan como antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios, protectores cardiovasculares e anticanceríxenos (Zimmer *et al.*, 2012).

En España, produciuse un proceso de selección realizado por xeracións de agricultores, polo cal se crearon unha gran cantidade de ecotipos adaptados ás condicións locais (Pereira-Dias *et al.*, 2019) como o pemento de Padrón. Este ecotipo de pemento recibe o nome de *Capsicum annuum* L. var. *Annuum*, cultívase na provincia de A Coruña e posúe a Denominación de Orixe Protexida dende o 2009 baixo o nome de pemento de Herbón.

### **1.8. Alpechín**

A oliveira (*Olea europea*) é unha árbore da familia Oleaceae, nativo da rexión mediterránea, onde o seu froito xoga un papel importante na economía de moitos países desta zona (El Shimi & Mostafa, 2016). O cultivo de oliveiras, xunto coas industrias ou empresas directamente relacionadas, representa un dos principais sectores do sistema agroalimentario español (Vallesquino-Laguna *et al.*, 2010), sendo tras os cereais o segundo cultivo en extensión a nivel nacional.

O froito desta árbore denomínase oliva e dela obtense o aceite de oliva. Os produtores de aceite de oliva máis importante son España e Italia (Ramos-Cormenzana *et al.*, 2010). Os procesos industriais que producen este aceite de oliva xeran unha cantidade considerable de augas residuais, denominadas “augas residuais de almazara” coñecidas como alpechín (El Shimi & Mostafa, 2016).

O alpechín é un líquido escuro, con diversas sustancias disoltas e en suspensión, recentemente producido ten un olor que recorda ao aceite, pero un olor fétido cando

fermenta (Cabrera, 1995). Estes residuos descárganse de maneira indiscriminatoria no solo ou na vía fluvial máis cercana, especialmente desde as pequenasalmazaras, sendo isto ilegal. Asalmazaras máis grandes almacenan o alpechín en estanques abertos ou cerrados. Con todo, seguen sendo fontes de contaminación para augas superficiais e subterráneas e de lodos que se deben eliminar (Ramos-Cormenzana *et al.*, 2010). Ambos métodos de almacenamento do alpechín son moi custosos debido aos custos de obra e mantemento.

Como se dixo anteriormente, o alpechín pode ser causante dunha contaminación e hai grandes dificultades no seu tratamento e eliminación, debido fundamentalmente a súa composición. O alpechín componse fundamentalmente de auga, minerais e sustancias orgánicas como ácidos orgánicos e fenoles (Ramos-Cormenzana *et al.*, 2010). O alpechín presenta un alto grado de contaminación orgánica que se traduce nunha alta demanda química de oxígeno (DQO) e posee un pH ácido, entre 3 e 6. Anque súa composición non é constante cualitativamente nin cuantitativamente e varía dacordo ao solo cultivado, tempo de colleita, grado de maduración do froito, variedade de oliva, condicións climáticas, uso de fertilizantes e de pesticidas (Pozzi *et al.*, 2010). Por todas estas características a aplicación continua de augas residuais de almazara ao solo sen ningún tratamento pode causar un impacto desfavorable nas plantas (Kavdir *et al.*, 2008), así como na estrutura do solo e na poboación microbiana.

Actualmente, invéstigase cómo obter produtos de valor e outros usos potenciais a partir destas augas residuais:

- Na industria alimentaria.
- Medio de crecemento de algas.
- Produción de sustancias biopoliméricas como polisacáridos e plásticos bidegradables.
- Produción de bioenerxía.
- Fonte de produtos biofarmacéuticos.

## **2. Obxectivos**

Neste traballo estúdase a capacidade elicitora da fracción purificada número 10 de alpechín (F10) sobre suspensións celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, analizando tanto o medio extracelular como o medio celular. Para elo propóñense os seguintes obxectivos:

- Inicio dunha liña celular de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* para obter suspensións celulares e elicitación das mesmas co extracto de alpechín.
- Determinación da concentración de fenoles totais e capacidade antioxidante no medio celular e extracelular.
- Análise da expresión xénica de *CaBPRI*, *CaSCI* e *CaPOI* mediante PCR a tempo real co obxectivo de comprobar si hai indución da resistencia en suspensión celulares.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Inicio dunha liña celular de *Capsicum annuum* L. var. *Annuum*.

##### 3.1.1. Medio de cultivo

Tipo de cultivo	Productos	Concentración
<b>Suspensións celulares</b>	Sales Murashige e Skoog	4.406 g/L
	Vitaminas de Morel	1 mL/L
	Caseína	0.25 g/L
	Sacarosa	30 g/L
	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	3 mg/L
	Kinetina	0.05 mg/L
<b>Callos</b>	Ágar	8 g/L
<b>Cultivo <i>vitro plant</i></b>	Sales Murashige e Skoog	4.406 g/L
	Vitaminas de Morel	1 mL/L
	Caseína	0.25 g/L
	Sacarosa	30 g/L

Táboa 1: Composición e concentración empregadas nos medios de cultivo.

Os medios de cultivo realízanse nun matraz de volume 1l ao que se lle engaden os compoñentes descritos na táboa 1. Unha vez feito isto, homoxeneízase a solución nun axitador magnético e mídese o pH, o cal debe estar en torno ao 5.8, de non ser así axústase a solución engadindo HCl ou NaOH.



### **3.1.2. *Vitro plant***

O cultivo de plantas de pemento *in vitro* ten como finalidade obter material vexetal estéril. Este proceso comeza coa esterilización das sementes, para elo as sementes envólvense nunha gasa que se sela cun clip. Mantéñense as sementes en axitación cun axitador electromagnético e unha mosca, mentres se somerxen nunha solución de etanol ao 70% dous minutos e nunha de hipoclorito ao 20% sobre uns vinte minutos. A continuación, en condicións de esterilidade, na cabina de fluxo laminar, as sementes lávanse tres veces en auga estéril para eliminar os restos das solucións coas que se esterilizaron. Sobre un papel de filtro e coa axuda dunhas pinzas e un bisturí extráense as sementes da gasa, as cales se colocan sobre un novo papel de filtro onde secan durante unha hora aproximadamente. Unha vez que as sementes están secas, estas inocúlanse no sentido das agullas do reloxo nun bote de cristal con tapa e con medio nutritivo sen hormonas. Finalizada a inoculación, o bote sélase con parafilm e incúbase nunha cámara de cultivo, cuxas condicións de temperatura é de 24°C, cun período de luz de 16 horas e 8 de escuridade.

### **3.1.3. Indución e repicado de callos**

Os callos indúcense a partir das plantas de pemento obtidas *in vitro* e en condición de esterilidade na cabina de fluxo laminar. Selecciónanse aquelas plantas de pemento que presenten maior vigor, é dicir, aquelas que non presenten clorose ou necrose. As plantas seleccionadas son fragmentadas, as follas (tanto cotiledóneas como verdadeiras) córtanse lonxitudinalmente, mentres que o talo de forma transversal. Posteriormente, inocúlanse ditos fragmentos en unha placa petri con medio nutritivo con hormonas e no sentido das agullas do reloxo. Estas placas petri incúbanse a temperatura ambiente e en condicións de escuridade.

Tras un mes de incubación, nos bordes da materia vexetal fórmanse pequenas masas celulares indiferenciadas, as cales se deben transferir ao un novo medio nutritivo con hormonas para que se sigan crescendo. Este proceso realízase en condición de esterilidade na cabina de fluxo laminar, coa axuda dunhas pinzas e un bisturí, retirase a parte vexetal e os callos formados transfírese a unha nova placa petri con medio nutritivo con hormonas. Estes callos son fragmentados co bisturí e ao mesmo tempo coa folla do bisturí, prémense para que haxa un maior número de células en contacto co medio. Finalmente sélase a placa con parafilm e incúbanse a temperatura ambiente e en condicións de escuridade.

Unha vez que os callos acadan un tamaño considerable, débense repicar para manter un stock de material vexetal. Para elo, en condicións de esterilidade na cámara de fluxo laminar, frágntase o callo cun bisturí e transfírese parte del para unha placa petri con medio nutritivo con hormonas, onde se preme coa folla do bisturí co fin de que o maior número de células esteen en contacto co medio. Sélase a placa petri con parafilm e incúbanse a temperatura ambiente e en condicións de escuridade.

#### **3.1.4. Inicio de suspensións celulares e repicado**

O inicio de suspensións celulares realízase a partir de callos friables en crecemento. O inicio de suspensións celulares realízase en condicións de esterilidade na cámara de fluxo laminar, os callos seleccionados frágntanse cun bisturí e unhas pinzas. A continuación, pésanse 8 gramos de ditos callos e engádense a un matraz de volume 100 ml, onde se agregan 40 ml de medio líquido. Estes matraces tápanse con papel de aluminio estéril e incúbanse na cámara de cultivo, en condicións de escuridade, a unha temperatura de 24°C e en axitación a 139 r.p.m nun axitador orbital.

Tras unha incubación de 7-10 días aproximadamente, as suspensión celulares encóntranse en fase de saturación, polo que se debe engadir medio nutritivo líquido co fin de evitar a morte celular e que sigan en fase de crecemento exponencial. O repicado das suspensións celulares faise en condicións de esterilidade na cámara de fluxo laminar, onde se realiza unha dilucións de 1:2. Para levala a cabo, engádense aos matraces 40 ml de medio líquido, homoxeneízase e divídese a suspensión en dous matraces de volume 100 ml. Finalmente incúbanse nas condición nomeadas no parágrafo anterior.

### **3.2. Elicitación das suspensións celulares.**

#### **3.2.1. Obtención de suspensión celulares para a elicitación.**

O inicio de suspensión celular se realiza para obter 4 matraces en cada experimento, os cales dous representan o control e outros dous os tratados. Para obter suspensións celulares para a experimentación, pártese de suspensións celulares saturadas. En condicións de esterilidade na cámara de fluxo laminar, fítranse nun coador as suspensións saturadas e cunha espátula, prémese suavemente o material vexetal extraído para eliminar o máximo posible o medio líquido. Posteriormente, pésanse 3 gramos da masa celular filtrada e engádense a un matraz de volume 100 ml, o cal se engaden 20 ml

de medio líquido. Finalmente incúbanse na cámara de cultivo, en condicións de escuridade, a unha temperatura de 24°C e en axitación a 139 r.p.m nun axitador orbital.

### **3.2.2. Elicitación das suspensión celulares**

As suspensión celulares elicítanse tras 24 horas de incubación. A elicitación realízase en condicións de esterilidade na cámara de fluxo laminar e consiste en agregar 200 µl de elicitor ás suspensións celulares. Para aquelas que representan o control, engádesse 200 µl de auga destilada esterilizada e para as suspensións tratadas engádesse 200 µl de alpechín. O extracto de alpechín é a fracción enriquecida número 10 proporcionada polo Dr. Marín Pródanov (Universidad Autónoma de Madrid), colaborador deste proxecto. Este extracto de alpechín foi diluído 1:20. Ambos elicitores esterilízanse mediante a súa filtración a través dun filtro de 0.22 µm

### **3.3. Recollida de mostras**

A recollida de mostras realízase as 6 horas e as 24 horas, polo que, por cada experimento, temos: control 6 horas, control 24 horas, alpechín 6 horas e alpechín 24 horas e realízase por filtrado ao baleiro grazas a unha bomba de baleiro. Como consecuencia por unha parte obtéñense as células, estas gárdanse en tubos, pésanse e conxélanse rapidamente en etanol absoluto a -80°C durante ao menos 5 minutos e posteriormente gárdanse no conxelador de -80°C. Por outra parte, extráese o medio extracelular, o cal mídese o seu volume e se conserva en tubos no conxelador a -20°C.

### **3.4. Procesado das mostras celulares.**

As células débense romper para posteriormente extraer fenoles, antioxidante e o ARN. Para elo úsase unha técnica física, as células conxeladas machúcanse nun morteiro mantendo a condición de frío grazas ao nitróxeno líquido, co fin evitar a degradación do ARN. Unha vez que se obtivo un polvo fino branco, este repártese en varios ependorfís anotándose o seu peso. Os ependorf gárdanse a -80°C ata o seguinte procesado.

### **3.5. Contido total de fenoles e actividade antioxidante do medio celular e extracelular.**

#### **3.5.1. Extracción de fenoles e antioxidantes do medio celular.**

Pártese dun ependorf con homoxeneizado celular, o cal se pasa a un tubo con tapa e engádesse 2,5 ml de metanol ao 80%. Incúbase durante 15 minutos a 70°C. A continuación, realízase unha centrifugación a 4000 r.p.m. durante 10 minutos. Recupérase o sobrenadante para un tubo graduado e o pellet, resuspéndese en 2,5 ml de

metanol ao 80% e sométese a unha nova centrifugación a 4000 r.p.m. durante 10 minutos. Posteriormente, recupérase o sobrenadante que se engade o recuperado no paso anterior. Finalmente afórase con metanol ao 80% ata 10 ml.

### 3.5.2. Determinación do contido total de fenoles.

A determinación de fenoles realízase mediante o método de Slinkard & Singleton (1977) modificado por Kraujalyte *et al.* (2015), no cal se usa o reactivo de Folin-Ciocalteu diluído 1:10.

En primeiro lugar, realízase a recta de calibrado, na cal se utiliza diferentes concentracións coñecidas de ácido gálico: 0,01 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,10 mg/mL y 0,20 mg/mL Nun tubo de ensaio, engádense 100 µl de ácido gálico e 1000 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu para cada concentración, realízanse 3 réplicas. O branco consiste en engadir 100 µl de auga destilada en lugar do ácido gálico. Incúbase en escuridade durante 4 minutos e a continuación, agrégase ao tubo 1000 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ao 7% e 400µl de auga destilada. Homoxenéizase nun vórtex e incúbase en escuridade uns 90 minutos. Finalmente realízase a medición da absorbancia a unha lonxitude de onda de 725 nm. Unha vez obtidos os datos, estes lévanse ao programa Microsoft Office Excel 2016, onde se procesan para obter a recta de calibrado. Obtívose e seguinte recta de calibrado cunha bondade de axuste de 0.992 (Fernández, 2018):

$$y = 5.599x + 0.013$$

A determinación de fenoles das mostras celulares e de medio extracelular, segue o mesmo procedemento, agás que se engade 100 µl de mostra no canto de ácido gálico. Finalmente, calculase a concentración de fenoles grazas a recta de calibrado.

### 3.5.3. Determinación da actividade antioxidante.

A determinación da actividade antioxidante realízase seguindo o método de Thaipong *et al.* (2006). A molécula 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) é unha molécula que en estado oxidado (cun radical libre) presenta cor morada. En presenza dun composto antioxidante, o radical libre do DPPH únese a el, o que provoca un cambio na súa coloración, pasando a ser amarelo. Este cambio de cor provoca un cambio na absorbancia da dilución, polo que se pode calcular o porcentaxe de DPPH que se reduciu grazas os compostos antioxidantes pola formula:

$$\% DPPH \text{ reducido} = \frac{A_0 - A_X}{A_0} * 100$$

Sendo A0 a absorbancia da dilución nai e AX a absorbancia da mostra.

Para a determinación da activade antioxidante das mostras é preciso unha recta de calibrado. Esta recta de calibrado realízase con Trolox, unha sustancia con capacidade antioxidante análogo a vitamina E, o cal se encontra en diferentes concentracións: 10, 20, 30, 40, 50, 100 e 200µM. Primeiro, pártese dunha dilución nai de DPPH a 1mM, a partir da cal se realizan unha serie de dilucións ata acadar unha cuxo valor de absorbancia sexa de 0.800 a 525nm, como branco úsase metanol absoluto. Unha vez conseguida a dilución axeitada (conservada en escuridade para que non perda as súas propiedades), cóllense 950 µl de dita dilución para unha cubeta onde engadimos 50 µl de Trolox (para cada concentración realízanse tres réplicas) e mídese a súa absorbancia a 525 nm. Unha vez obtidos os datos, estes lévanse ao programa Microsoft Office Excel 2016, onde se procesan para obter a recta de calibrado. Obtívose e seguinte recta de calibrado cunha bondade de axuste é de 0.9922:

$$y = 0.0971x + 4,3698$$

Finalmente, realízase a medida das absorbancias das mostras, as cales seguen o mesmo procedemento, substituíndo os 50 µl de Trolox por 50 µl da mostra.

### **3.6. Expresión dos xenos *CaBPRI*, *CaSC1* e *CaPO1*.**

#### **3.6.1. Extracción de ARN.**

A extracción e purificación de ARN realízase con E.Z.N.A® Plant RNA Kit (OMEGA bio-tek), seguindo o protocolo do fabricante para mostras difíciles. Este kit extrae e purifica o ARN grazas a columnas HiBind®, as cales conteñen unha matriz onde se produce a unión reversible do ARN e logo é eludido con auga DEPC estéril. Ademais este kit posúe buffers para lisar e eliminar restos celulares xunto con outros contaminantes.

#### **3.6.2. Síntese de cDNA.**

Unha vez que se extrae o ARN, realízase a síntese de cDNA (DNA complementario) mediante unha reacción en cadea da polimerasa con transcriptasa inversa. Para elo úsase o kit iScript™ cDNA Synthesis Kit de BIO RAD, seguindo o seu protocolo e programa para o termociclador. Este kit ten todo o necesario para realizar a RT-PCR, incluída a enzima transcriptasa inversa.

### 3.6.3. PCR a tempo real

A PCR en tempo real é unha variante da PCR convencional, con esta técnica pódese amplificar ADN e ao mesmo tempo cuantificalo de forma absoluta. A detección de ADN amplificado realízase mediante sinais de intensidade de fluorescencia que se producen en cada ciclo da PCR. O parámetro a ter en conta a hora de realizar os cálculos e así obter resultados é o Ct (*Threshold Cycle*), ciclo umbral ou ciclo de cuantificación. Este parámetro establecece durante a fase lineal do gráfico de amplificación, é dicir, cando a molécula de ADN se está a amplificar de forma exponencial. O valor de Ct é inversamente proporcional ao número de copias de ADN molde, isto tradúcese en que cantas máis copias de ADN molde haxa, valores máis baixos tomará Ct, e viceversa.

As mostras de cDNA obtidas polo paso anterior enviáronse a Unidade de Bioloxía Molecular dos Servizo de Apoio a Investigación (SAI) da UDC onde se realiza unha PCR a tempo real para estudar a expresión dos xenos *CaBPRI* (unha proteína PR1), *CaSCI* (unha sesquiterpeno ciclasa) e *CaPOI* (unha peroxidasa), utilizándose como xene de referencia o xene da actina, *CaACT*. O kit que se emprega é Biorad iCycle<sup>TM</sup>iQ System e as características dos cebadores móstranse na táboa 2.

Xene	Nº acceso	Ref.	Amplicón	Nome	Secuencia
<i>CaACT</i>	AY572427	(Silvar <i>et al.</i> , 2008)	128 pb	CaACTFw	5'ATCCCTCCACCTCTTCACTCTC3'
				CaACTRv	5'GCCTTAACCATTCTGTCCATTATC3'
<i>CaBPRI</i>	AF053343	(Gayoso <i>et al.</i> , 2007)	301 pb	PR1Fw	5'GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT3'
				PR1Rv	5'CAAGCAATTATTTAAAGATCCA3'
<i>CaSCI</i>	AF061285	(Silvar <i>et al.</i> , 2008)	312 pb	CaSCFW	5'GCCTCCTGCTTCTGAATACC3'
				CaSCRv	5'TTAATATCCTTCCATCCCGACT3'
<i>CaPOI</i>	AF442386	(García <i>et al.</i> , 2015)	333 pb	CAPO1FW	5'ACACTGGAAGCGTGAACAAT3'
				CAPO1RV	5'CAGCTTGCGCTAACATGAAC3'

Táboa 2: Característica dos cebadores empregados na PCR a tempo real.

Unha vez que se obteñen os resultados da expresión xénica, débese ter en conta a eficiencia da amplificación para posteriormente cuantificar sen que haxa unha sobreestimación, a concentración de ADN inicial. A eficiencia calcúlase coa seguinte fórmula:

$$E = (10^{-\frac{1}{k}}) - 1$$

Onde  $k$  é a pendente da gráfica de amplificación en base logarítmica, na cal se obtén unha recta de amplificación.

O cálculo do cambio da expresión xénica realízase mediante o modelo matemático de Pfaffl (Pfaffl, 2001). o cal ten en conta a eficiencia e normaliza a expresión xénica a un xene de referencia (xene control) na seguinte fórmula:

$$\text{Radio da expresión xénica} = \frac{(E_{\text{xene diana}})^{\Delta Ct (\text{xene control}-\text{xene diana})}}{(E_{\text{xene referencia}})^{\Delta Ct (\text{xene control}-\text{xene diana})}}$$

### 3.7. Análise estatístico

O análise estatístico realizouse co programa StatGraphics. Dado que os datos non se axustan aos requisitos dos test paramétricos (ausencia de normalidade dos residuos estandarizados e homoscedasticidade), o análise estatístico realizouse cun método non paramétrico como é a proba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas. Considerándose diferenzas significativas, cando a proba de W de Mann-Whitney (Wilcoxon) obtivo un p-valor <0.05.

## 4. Resultados e discusión

### 4.1. Obtención de *vitro plant*

O método polo cal se obtiveron as plántulas de pemento resultou ser o adecuado. Os 10 días da inoculación das sementes esterilizadas nun medio nutritivo, obtivéronse plántulas de pemento completas (Figura 4). O material usado, medio nutritivo, sementes e material de laboratorio, resultou estar ben esterilizado, xa que non se presentaron problemas de contaminación. Ademais os compostos usados para esterilizar as sementes non afectaron a taxa de xerminación das plántulas.



Figura 4: Plántula de pemento na cámara de cultivo.

## 4.2. Obtención e repicado de callos

As primeiras masas celulares indiferenciadas apareceron nos bordes dos fragmentos vexetais ao cabo dun mes aproximadamente (Figura 5). O medio nutritivo resultou ter a concentración de hormonas adecuada para que se producise a desdiferenciación. A esterilizada tamén foi a idónea, presentándose poucos casos de contaminación.

O repicado de callos das primeiras masas celulares desdiferenciadas realizouse ao cabo dun mes aproximadamente, e ao seguinte mes aproximadamente, obtense un callo completamente formado (Figura 5). Estes tamén se repican unha ou dúas veces ao mes para aumentar o material vexetal e así poder iniciar suspensións celulares, así como para obter material vexetal en *stock*.

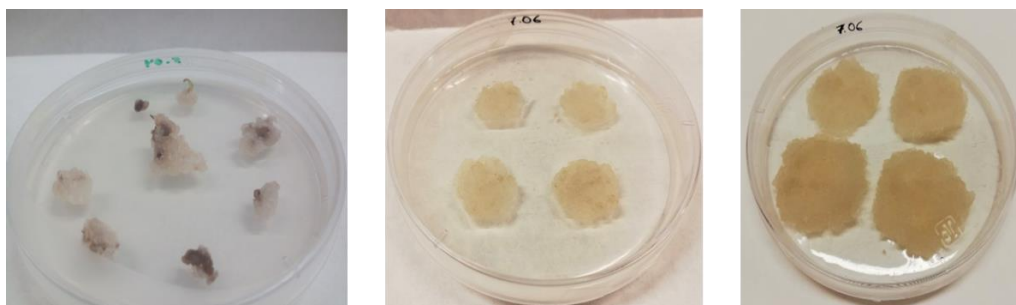


Figura 5: Indución de callos e diferentes estados de desenvolvemento.

## 4.3. Obtención de suspensións celulares

As suspensións celulares obtivéronse a partir dos callos friables, os cales se levaron a medio líquido e se mantiveron en axitación e oscuridade. A esterilizada foi a adecuada, xa que os casos de contaminación foron escasos. Ademais non se produciron suspensións celulares de color pardo debido a oxidación.

O primeiro repicado das suspensións celulares realizouse cando estas se encontraban saturadas (Figura 6), o cal foi aos 15 días do inicio. O tempo de saturación alongouse máis do habitual no tempo, en parte puido deberse ao estado do callo do cal se partiu, xa que se encontraba na fase estacionaria. O repicado da suspensión celular realizouse en perfectas condicións de esterilidade, xa que non se presentaron matraces con contaminacións. Ademais resultou unha solución idónea para establecer unha liña celular cunha alta taxa de crecemento. A partir do primeiro repicado, as suspensións celulares acadaban a fase estacionaria en menos dunha semana, polo que era necesario diluílas cada semana. Como consecuencia obtivéronse suficientes matraces de suspensións celulares e en condicións idóneas para a seguinte fase experimental.



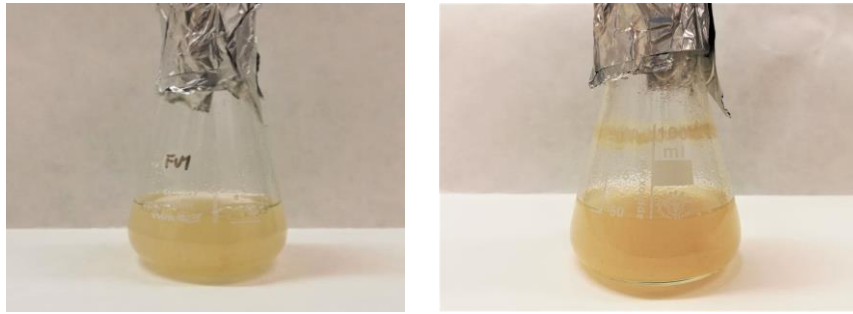


Figura 6: Suspensión celular iniciada e suspensión celular saturada.

#### 4.4. Fenoles

Os resultados obtidos do contido de fenoles no medio celular están representados nas figuras 7 e 8. O análise estatístico indica que non hai diferencias significativas entre o contido de fenoles no medio celular das suspensións celulares elicidadas con extracto de alpechín e as control, tanto as 6 horas como as 24 horas. Anque si se pode observar que o extracto de alpechín tende a aumentar o contido de fenoles no medio celular. As 6 horas (Figura 7), o contido de fenoles das suspensións celulares elicidadas con extracto de alpechín era dun 213% máis con respecto ás suspensións celulares control, pero este aumento non é significativo na proba non paramétrica. As 24 horas (Figura 8), as suspensións celulares elicidadas con extracto de alpechín teñen un 18% máis de contidos fenólicos que as suspensión control.

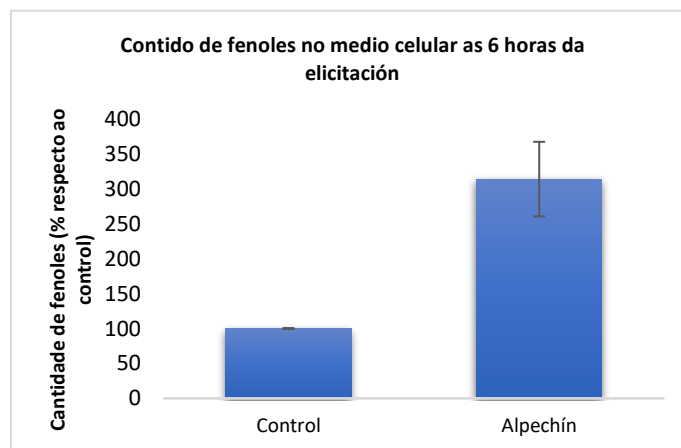
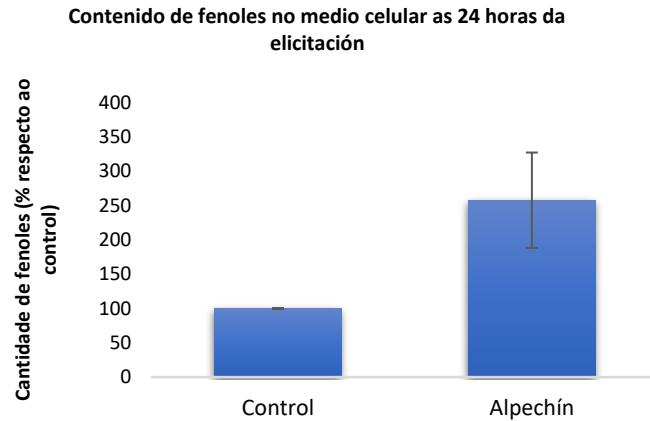
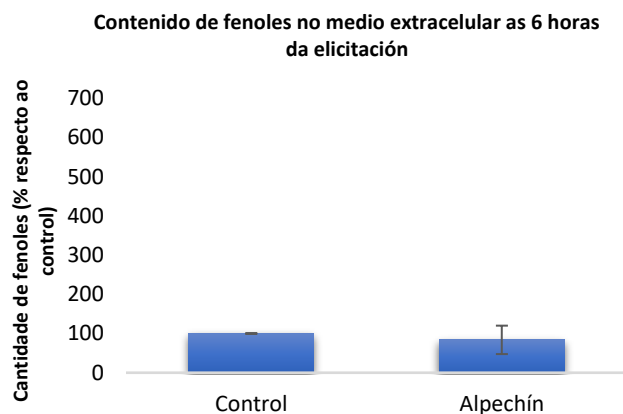


Figura 7: Contido de fenoles no medio celular as 6 horas da elicitación, representado polo porcentaxe de cantidade de fenoles en comparación ao control.

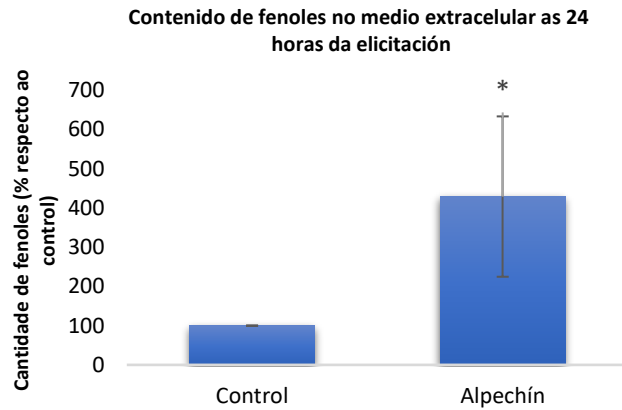


*Figura 8: Contido de fenoles no medio celular as 24 horas da elicitación, representado polo porcentaxe de cantidade de fenoles en comparación ao control.*

Os resultados obtidos do contido de fenoles do medio extracelular están representados nas figuras 9 e 10. O análise estatístico indica que non hai diferencias significativas entre o contido de fenoles do medio extracelular das suspensións celulares elicidadas con extracto de alpechín e as control, as 6 horas, pero si hai diferencias significativas as 24 horas. As 6 horas (Figura 9), o contido de fenoles das suspensión celulares elicidadas con extracto de alpechín tiñan un 16% con respecto ás suspensións celulares control. As 24 horas (Figura 10), as suspensións celulares elicidadas con extracto de alpechín teñen un 40% máis de contido de fenoles que as suspensión control.



*Figura 9: Contido de fenoles no medio extracelular as 6 horas da elicitación, representado polo porcentaxe de cantidade de fenoles en comparación ao control.*



*Figura 10: Contido de fenoles no medio extracelular as 24 horas da elicitación, representado polo porcentaxe de cantidade de fenoles en comparación ao control. O asterisco (\*) indica diferenzas significativas.*

Por tanto, o extracto de alpechín tende a aumentar o contido de fenoles no medio celular tanto as 6 horas como as 24 horas, pero o test estatístico non é significativo. Por outro lado, o contido de fenoles no medio extracelular nas suspensións elicidadas con extracto de alpechín diminúe as 6 horas, aumentando as 24 horas e habendo diferenzas significativas coas suspensións celulares control.

Datos similares obtivo Díaz *et al.* (2019), en onde se estudou o efecto de dous extractos de alpechín, as fraccións purificada número 10 e número 12 en plantas de pemento. A fracción número 10, provocaba un aumento no contido dos fenoles solubles nas raíces as 24 horas de elicitación, anque non era significativo estatisticamente. Por outra parte a fracción purificada número 12 producía unha diminución no contido de fenoles solubles das raíces as 24 horas, semellante a que se produce neste estudo no medio extracelular as 6 horas de elicitación. Unha posible explicación para estes datos é que o extracto de alpechín provoca un estrés oxidativo e nun primeiro momento as células responden consumindo os fenoles do medio extracelular.

#### **4.5. Capacidade antioxidante**

Os resultados obtidos da capacidade antioxidante do medio celular están representados nas figuras 11 e 12. O análise estatístico indica que non hai diferenzas significativas entre a capacidade antioxidante do medio celular das suspensións celulares elicidadas con extracto de alpechín e as control, as 6 horas, pero si hai diferenzas significativas as 24 horas. As 6 horas (Figura 11), a capacidade antioxidante das suspensión celulares elicidadas con extracto de alpechín era dun 27% máis con respecto ás suspensións

celulares control. As 24 horas (Figura 12), as suspensións celulares elicítadas con extracto de alpechín teñen un 40% máis de actividade antioxidante que as suspensión control.

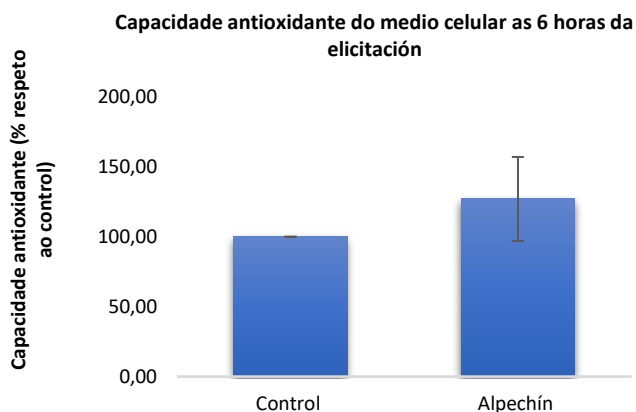


Figura 11: Capacidade antioxidante do medio celular as 6 horas da elicitación, representado polo porcentaxe de capacidade antioxidante en comparación ao control. Os datos representa a media dos 4 experimentos  $\pm e$  o error estándar.

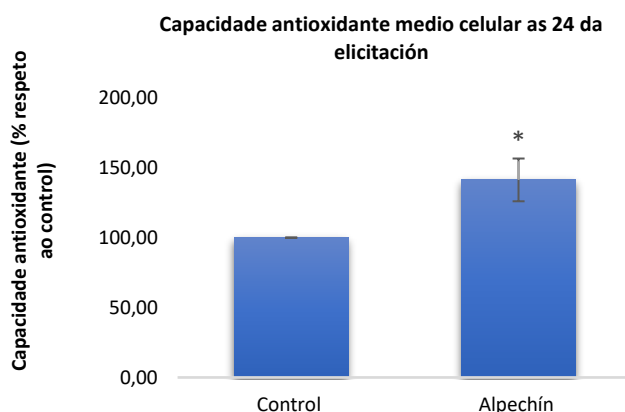


Figura 12: Capacidade antioxidante do medio celular as 24 horas da elicitación, representado polo porcentaxe de capacidade antioxidante en comparación ao control. Os datos representa a media dos 4 experimentos  $\pm e$  o error estándar. O asterisco (\*) indica diferenzas

Nas figuras 13 e 14 móstranse os resultados obtidos da capacidade antioxidante do medio extracelular. O análise estatístico indica que non hai diferenzas significativas entre as suspensións celulares control e as elicítadas co extracto de alpechín as 6 horas (Figura 13), pero sí hai un aumento da capacidade antioxidante das suspensións celulares elicítadas nun 29%. Con respecto aos resultados obtidos as 24 horas (Figura 14), o análise estatístico indica que hai diferenzas significativas entre as suspensións

elicitadas con extracto de alpechín e as control. O extracto de alpechín provoca un aumento do 96% da capacidade antioxidante nas suspensións celulares tratadas con alpechín.

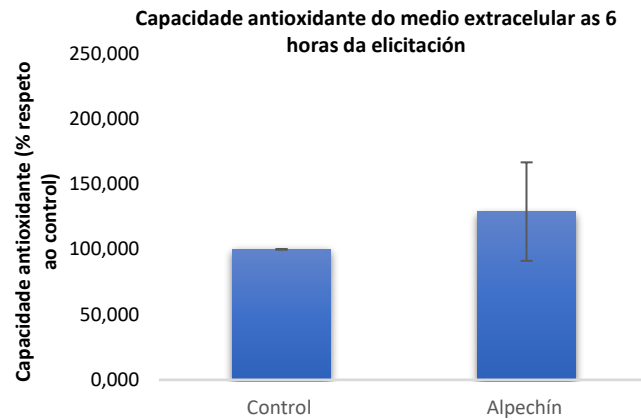


Figura 13: Capacidade antioxidante do medio extracelular as 6 horas da elicitación, representado polo porcentaxe de capacidade antioxidante en comparación ao control. Os datos representa a media dos 4 experimentos  $\pm$  e o error estándar.

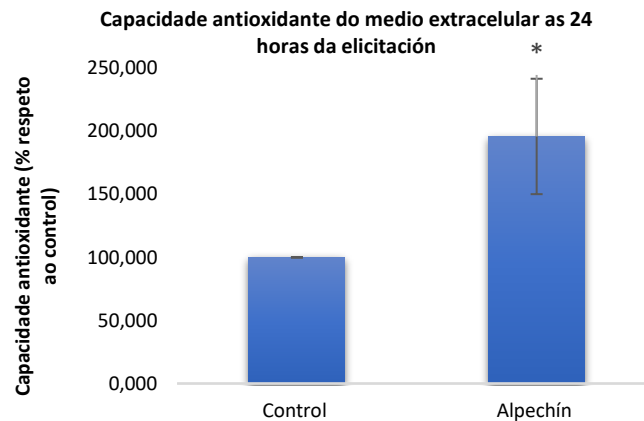


Figura 14: Capacidade antioxidante do medio extracelularcelular as 24 horas da elicitación, representado polo porcentaxe de capacidade antioxidante en comparación ao control. Os datos representa a media dos 4 experimentos  $\pm$  e o error estándar. O asterisco (\*) indica diferenzas significativas.

Os resultados obtidos mostran que o extracto de alpechín tende a aumentar o nivel da capacidade antioxidante das suspensións celulares, sendo un aumento significativo as 24 horas da elicitación. Estes resultados concordan cos datos obtidos para o contido de

fenoles, a medida que aumenta o contido fenólico, aumenta a capacidade antioxidante. Anque hai unha excepción, o contido fenólico no medio extracelular as 6 horas (Figura 9) non parece corresponder ao aumento da capacidade antioxidante no medio celular as 6 horas (Figura 13). Este resultado pode ser debido a que a capacidade antioxidante é un produto combinado entre metabolitos secundarios e enzimas. Ademais, na determinación do contido de fenoles pode que haxa compostos que non se están a detectar e teñan capacidade antioxidante (Materska & Perucka, 2005).

En xeral, o extracto de alpechín parece inducir ao metabolismo secundario das plantas, como consecuencia prodúcese a síntese e a liberación de fenoles e moléculas antioxidantes que permanecen na célula ou se libran cara o medio extracelular e este fenómeno é significativo as 24 horas da elicitación.

Este traballo forma parte dun proxecto onde se buscan estratexias alternativas para controlar enfermidades en cultivos hortícolas, buscando unha resistencia da planta. Neste contexto López (2019) realizou un estudo con dous extractos de *Moringa*, un etanólico e un acuoso. O extracto de etanol produciu un aumento significativo as 6 horas de elicitación, mentres que o extracto acuoso non produciu un aumento significativo. En canto a capacidade antioxidante no medio extracelular, o extracto de etanol non produciu un aumento de dita capacidade, anque si aumentou significativamente as 6 e 24 horas co extracto acuoso. Si comparamos resultados, o extracto de alpechín parece ser un bo indutor da síntese e liberación de fenoles e compostos antioxidantes cara o medio extracelular que o os extractos de *Moringa*.

Por outra banda, este estudio é a continuación do TFG realizado por Fernández (2018). Neste estudio, as suspensións celulares de pemento son elicidadas cun extracto de *Moringa*, os resultados para o contido de fenoles no medio extracelular foi un aumento significativo as 96 horas nas suspensións tratadas con respecto as control, resultados semellantes aos que se tiveron co extracto de alpechín as 24 horas no medio extracelular. No estudo de Fernández (2018), a capacidade antioxidante non se viu aumentada polo extracto de *Moringa*. Isto parece indicar que o extracto de alpechín, ten mellores resultados para inducir as defensas antioxidantes das suspensións celulares.

#### **4.6. Expresión xénica**

Neste traballo estúdase a expresión de tres xenes: *CaBPR*, *CaSCI* e *CaPOI*.

O xene *CaBPR1* codifica para a proteína básica relacionada coa patoxénese 1 en *Capsicum annuum*. As proteínas relacionadas coa patoxénese (PR) indúcense e acumúlanse na planta cando esta sofre unha infección por un patóxeno (impide que este se desenvolva e se propague) ou cando sofre unha condición de estrés abiótico (Sarowar *et al.*, 2005). Ademais, este tipo de proteínas úsanse como marcador da resistencia sistemática adquirida xa que son inducidas por patóxenos, o ácido salicílico e o etileno (Sarowar *et al.*, 2005).

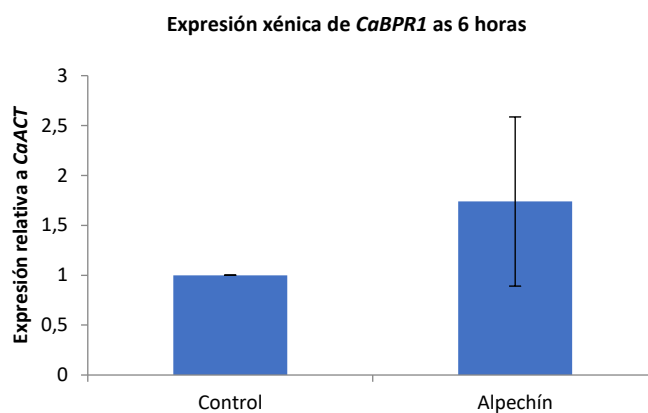
O xene *CaSCI* codifica para a enzima sesquiterpeno ciclase de *Capsicum annuum*. Esta enzima participa na síntese de sesquiterpenoides naturais como é a fitoalexina capsidiol, amplamente distribuídos en plantas, o que suxire que ten unha gran importancia nas interaccións planta-planta e planta-patóxeno (Back *et al.*, 1998). A fitoalexina é un metabolito secundario con actividade antimicrobiana producida como resposta a unha infección, un dano mecánico (ferida), un axente químico ou a un estrés (Mateos & Leal, 2003). A súa citotoxicidade radica en que ataca a integridade do patóxeno evitando a súa propagación ou a infección por parte dun novo patóxeno.

O xene *CaPOI* codifica para a enzima peroxidasa de *Capsicum annuum*. As peroxidases son enzimas óxido-reductoras que presentan dúas funcións moi diferentes, por un lado actúan como enzimas antioxidantes cuxo sustrato é o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por outro lado, teñen un papel importante na resistencia a patóxenos. A expresión de *CaPOI* está relacionado co estalido oxidativo que ten lugar coa resposta hipersensible en plantas resistentes, producindo especies reactivas de osíxeno que actúan de sinal e crean un ambiente tóxico para os patóxenos (Chmielowska *et al.*, 2010) e a súa actividade está regulada por hormonas. Outra forma que teñen se inducir a resistencia as peroxidases é engrosando a parede celular ao estar involucrada na deposición de lignina e suberina, creando así unha barrera estrutural que impide a entrada de patóxenos.

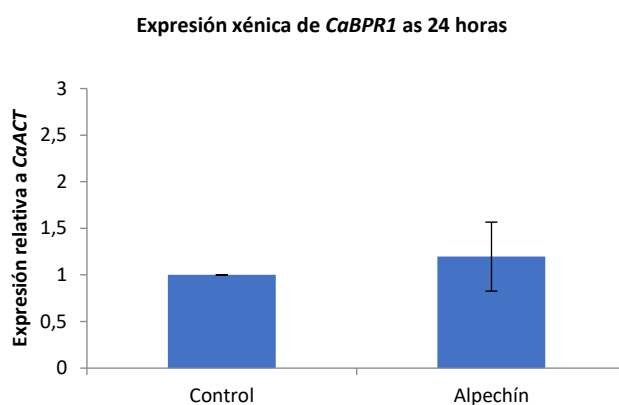
##### **4.6.1. *CaBPR1***

Nas figuras 15 e 16 móstranse os resultados da expresión xénica para o xene *CaBPR1*. O análise estatístico indica que non hai diferenzas significativas entre as suspensión elicidadas con extracto de alpechín e as control, tanto as 6 horas como as 24 horas. A

pesar disto, si que se pode ver que o extracto de alpechín provoca un lixeiro aumento da expresión do xene *CaBPR1*.



*Figura 15: Expresión xénica de *CaBPR1* as 6 horas de elicitar. Os datos representan a media dos 3 experimentos  $\pm$  el error estándar.*



*Figura 16: Expresión xénica de *CaBPR1* as 24 horas de elicitar. Os datos representan a media dos 3 experimentos  $\pm$  o error estándar.*

#### **4.6.2. *CaSC1***

Os resultados da expresión xénica obtidos para o xene *CaSC1* as 6 horas e 24 horas logo da elicitación móstranse nas figuras 17 e 18. O análise estatístico confirma que non hai diferencias significativas na expresión de *CaSC1* en células tratadas con extracto de alpechín e as control as 6 horas da elicitación (Figura 17). Por outra banda, as 24 horas de elicitación (Figura 18) obsérvase un aumento na expresión de *CaSC1* e o análise estatístico indica que é significativo.



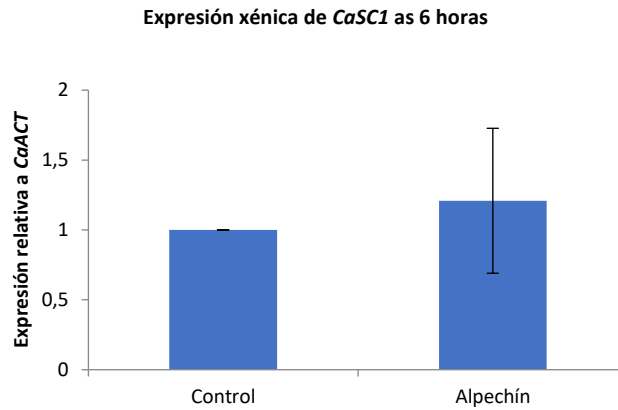


Figura 17: Expresión xénica de *CaSC1* as 6 horas de elicitar. Os datos representan a media dos 3 experimentos  $\pm$  o error estándar.

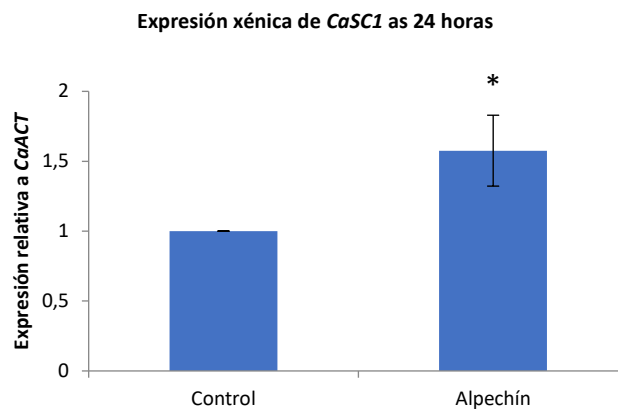


Figura 18: Expresión xénica de *CaSC1* as 24 horas de elicitar. Os datos representan a media dos 3 experimentos  $\pm$  o error estándar. O asterisco (\*) indica diferenzas significativas.

#### 4.6.3. *CaPO1*

Os resultados as 6 horas da elicitación móstranse na figura 19, obsérvase que practicamente non hai diferenzas na expresión de *CaPO1* entre as suspensións celulares tratadas e as control. O análise estatístico non é significativo as 6 horas da elicitación.

Os resultados as 24 horas da elicitación móstranse na figura 20, obsérvase que hai un aumento na expresión de *CaPO1* nas suspensións celulares elicidadas con extracto de alpechín. O análise estatístico confirma que este aumento na expresión de *CaPO1* é significativo.

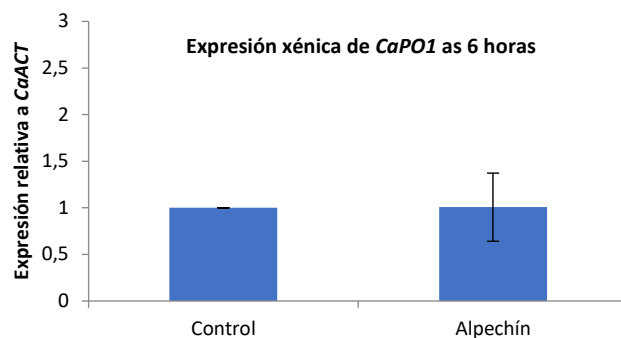


Figura 19: Expresión xénica de CaPO1 as 6 horas de elicitar. Os datos representan a media dos 3 experimentos  $\pm$  o error estándar.

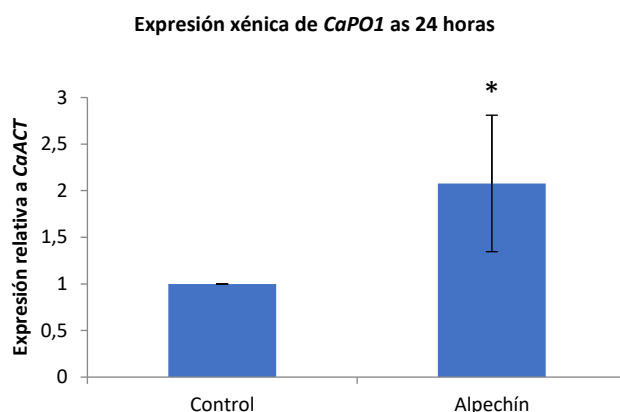


Figura 20: Expresión xénica de CaPO1 as 24 horas de elicitar. Os datos representan a media dos 3 experimentos  $\pm$  o error estándar. O asterisco (\*) indica diferenzas significativas.

Os resultados obtidos indican que o extracto de alpechín inducen a expresión de *CaSCI* e *CaPO1* significativamente as 24 horas da elicitación das suspensións celulares. O xene *CaBPRI* tamén sofre un aumento na súa expresión as 6 horas e as 24 horas da elicitación, pero o análise estatístico conclúe que non é significativo. Este aumento na expresión de xenes está acompañada nun aumento significativamente de antioxidantes as 24 horas tanto no medio celular como no extracelular e o aumento significativo do contido de fenoles no medio extracelular as 24 horas de elicitación. Baseándose neste aumento de antioxidante e do contido fenólico, xunto co aumento da expresión da peroxidasa *CaPO1*, a cal podería estar funcionando como unha enzima antioxidante, o alpechín parece estar producindo un estrés oxidativo ao cal as células responden coa indución da síntese de compostos con actividade antioxidante. *CaSCI* e *CaBPRI* son xenes que codifican sustancias antimicrobianas e proteínas relacionadas coa patoxénese

(PR), cuxa expresión aumenta, o cal podería indicar que o alpechín pode ser un indutor da resistencia sistémica adquirida.

Díaz *et al.* (2019) estudou o efecto deste extracto de alpechín, a fracción purificada 10, *in vivo* en plantas de *Capsicum annuum*. O seus resultados son similares aos obtidos *in vitro* e indican que aumenta os niveis de expresión dos xenes *CaBPR1*, *CaSCI* e *CaPO1*, pero estatisticamente non son significativos. Ademais, estudou o contido de fenoles solubles, os resultados non foron significativo, pero sí se produciu un leve aumento no contido de fenoles en plantas tratadas co extracto de alpechín.

López (2019) estudou a expresión xénica das suspensións celulares elicidadas con ambos extractos de *Moringa*. Os xenes que analizou foron *CaBPR1* e *CaSCI*. Os resultados obtidos foron semellantes para ambos extractos e xenes, un aumento significativo as 6 horas e logo un descenso as 24 horas, coa excepción na expresión do xene *CaSCI* das suspensións celulares elicidadas co extracto acuoso, onde non se produce dito descenso. Os resultados obtido co alpechín mostraron unha tendencia a aumentar a expresión de ambos xenes e de *CaPO1* as 6 horas e 24 horas, sendo un aumento significativo para as 24 horas, salvo para o xene *CaBPR1*. Polo que o extracto de alpechín non produce unha resposta instantánea na expresión xénica como os extractos de *Moringa*, anque parece activar a expresión xénica con maior lentitude. Sería interesante estudar si este efecto no aumento da expresión xénica co extracto de alpechín se mantén ou polo contrario diminúe como acontece cos extractos de *Moringa*.

Por tanto, podería estar a producirse un estrés oxidativo ao que a célula responde con síntese de novo de compostos, ademais parece producirse unha sinalización que leva a indución da resistencia sistémica adquirida. Como consecuencia a elicitación con extracto de alpechín podería ser unha boa estratexia para inducir resistencia en cultivos, polo cal é interesante investigacións máis profundas sobre este efecto.

## 5. Conclusións

- O extracto da fracción purificada número 10 de alpechín induce a formación e liberación de compostos fenólicos, sendo significativo as 24 horas da elicitación no medio extracelular.

- O extracto da fracción purificada número 10 de alpechín induce a formación e liberación de compostos con capacidade antioxidante, sendo significativo tanto para medio celular e medio extracelular as 24 horas de elicitación.
- O extracto da fracción purificada número 10 de alpechín induce a expresión dos xenes *CaBPRI*, *CaSCI* e *CaPOI*, sendo significativo o aumento da expresión as 24 horas de elicitación para *CaSCI* e *CaPOI*.
- Os datos obtidos de forma conxunta, indican que o extracto da fracción purificada número 10 de alpechín ten potencialidade para inducir resistencia en cultivos celulares de pemento.

## 6. Bibliografía

- Ádám, A., Nagy, Z., Kátay, G., Mergenthaler, E., & Viczián, O. (2018).** Signals of systemic immunity in plants: Progress and open questions. *International journal of molecular sciences*, *19*(4), 1146.
- Back, K., He, S., Kim, K. U., & Shin, D. H. (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 and cell physiology*, *39*(9), 899-904.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, *99*(1), 191-203.
- Boutennoun, H., Boussouf, L., Rawashdeh, A., Al-Qaoud, K., Abdelhafez, S., Kebieche, M., & Madani, K. (2017).** *In vitro* cytotoxic and antioxidant activities of phenolic components of Algerian *Achillea odorata* leaves. *Arabian journal of chemistry*, *10*(3), 403-409.
- Cabrera, F. (1995).** Características y tratamiento de las aguas residuales industriales por sectores: molturado de aceituna para la obtención de aceite de oliva virgen. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/36124379.pdf> [Acceso 3 de setembro de 2018].
- Chmielowska, J., Veloso, J., Gutierrez, J., Silvar, C., & Díaz, J. (2010).** Cross-protection of pepper plants stressed by copper against a vascular pathogen is accompanied by the induction of a defence response. *Plant Science*, *178*(2), 176-182.

- Denev, P. N., Kratchanov, C. G., Ciz, M., Lojek, A., & Kratchanova, M. G. (2012).** Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols: *in vitro* and *in vivo* evidences and possible mechanisms of action: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(5), 471-489.
- Díaz, J., Pacheco, M., González, I., Fernández, N., López, J., Carrillo, N., Bernal, A., Pinto-Bustillos, Esteban, R. M., Prodanov, M., & Veloso, J. (2019).** Elicitors derived from *Moringa oleifera* and olive mill wastewater as resistance inducers in pepper. XXIII reunión nacional de la SEFV. Plamplona.
- El Shimi, H. I., & Mostafa, S. S. (2016).** Phycoremediation of olive oil wastes using cyanobacteria for sustainable biofertilizer and biodiesel production. *ARP. J. Eng. Appl. Sci*, 11, 10259-10272.
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018).** *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18.
- Fernández Vázquez, A. (2018).** Estudio da capacidade antioxidante do medio extracelular de suspensión elicidadas cun estrato de follas de *Moringa oleifera* [traballo de fin de grao]. A Coruña: Universidade da Coruña. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2183/21258> [acceso 5 de setembro de 2019].
- 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. García, T.,
- Gutiérrez, J., Veloso, J., Gago-Fuentes, R., & Díaz, J. (2015).** Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. *Journal of plant physiology*, 176, 202-209.
- Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. (2015).** Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International journal of biological sciences*, 11(8), 982.
- Kavdir, Y., & Killi, D. (2008).** Influence of olive oil solid waste applications on soil pH, electrical conductivity, soil nitrogen transformations, carbon content and aggregate stability. *Bioresource technology*, 99(7), 2326-2332.
- Khoddami, A., Wilkes, M., & Roberts, T. (2013).** Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.

- Kim, D. O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y., & Lee, C. Y. (2003).** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6509-6515.
- Kraujalytė, V., Venskutonis, P. R., 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 Chemistry*, 188, 583-590.
- López do Campo, J. (2019).** 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* [trabajo de fin de máster]. A Coruña: Universidade da Coruña. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2183/23122> [Acceso 1 de setembro de 2019].
- Mateos, R. G., & Leal, R. P. (2003).** Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 9(1), 5-10.
- Materska, M., & Perucka, I. (2005).** Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1750-1756.
- Molina, A., Vallet, A. S., & Sánchez-Rodríguez, C. (2007).** Inmunidad innata en plantas y resistencia a patógenos: nuevos conceptos y potenciales aplicaciones en protección vegetal. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (192), 43-46.
- Narayani, M., & Srivastava, S. (2017).** Elicitation: a stimulation of stress *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry reviews*, 16(6), 1227-1252.
- Paes, J. D. S., de Araújo, T. A., Ramos, R. S., Soares, J. R. S., de Araújo, V. C., & Picanço, M. C. (2019).** Economic injury level for sequential sampling plan of *Frankliniella schultzei* in bell pepper crops. *Crop Protection*, 123, 30-35.
- Paolis, A. D., Frugis, G., Giannino, D., Iannelli, M. A., Mele, G., Rugini, E., ... & Nicolodi, C. (2019).** Plant Cellular and Molecular Biotechnology: Following Mariotti's Steps. *Plants*, 8(1), 18.
- Peña-Cerda, M., Arancibia-Radich, J., Valenzuela-Bustamante, P., Pérez-Arancibia, R., Barriga, A., Seguel, I., ... & Delporte, C. (2017).** Phenolic composition

and antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz. leaves of different genotypes. *Food chemistry*, 215, 219-227.

**Pereira-Dias, L., Vilanova, S., Fita, A., Prohens, J., & Rodríguez-Burruezo, A. (2019).** Genetic diversity, population structure, and relationships in a collection of pepper (*Capsicum* spp.) landraces from the Spanish centre of diversity revealed by genotyping-by-sequencing (GBS). *Horticulture research*, 6(1), 54.

**Pfaffl, M. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9): 2002-2007.

**Pozzi, M. T., Filippín, A. J., Matías, C., & Hammann, A. (2010).** Posibilidad de uso del Alpechín en Fertilización de Tierras Agrícolas. *Información tecnológica*, 21(4), 117-123.

**Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sanchez, M., & Lopez, M. J. (1995).** Bioremediation of alpechin. *International biodeterioration & biodegradation*, 35(1-3), 249-268.

**Reche Marmol, J. (2010).** Cultivo del pimiento dulce en invernadero. *Estudios e informes técnicos. Consejería de Agricultura y pesca*.

**Saini, R. K., Prashanth, K. H., Shetty, N. P., & Giridhar, P. (2014).** Elicitors, SA and MJ enhance carotenoids and tocopherol biosynthesis and expression of antioxidant related genes in *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Acta physiologiae plantarum*, 36(10), 2695-2704.

**Sarowar, S., Kim, Y. J., Kim, E. N., Kim, K. D., Hwang, B. K., Islam, R., & Shin, J. S. (2005).** Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant cell reports*, 24(4), 216-224.

**Schmidt-Durán, A., Alvarado-Ulloa, C., Chacón-Cerdas, R., Alvarado-Marchena, L. F., & Flores-Mora, D. (2016).** Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) and its microscopic analysis. *SpringerPlus*, 5(1), 1717.

**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.

**Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977).** Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.

**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 4 de setembro de 2018].

**Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006).** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675.

**Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013).** Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *ISRN biochemistry*, 2013.

**Vallad, G. E., & Goodman, R. M. (2004).** Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop science*, 44(6), 1920-1934.

**Varga, M., Jójárt, R., Fónad, P., Mihály, R., & Palágyi, A. (2018).** Phenolic composition and antioxidant activity of colored oats. *Food chemistry*, 268, 153-161.

**Zimmer, A. R., Leonardi, B., Miron, D., Schapoval, E., De Oliveira, J. R., & Gosmann, G. (2012).** Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: from traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(1), 228-233.