



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR CELULAR Y GENÉTICA



EFFECTO DE PO212 SOBRE EL ESTRÉS POR COBRE EN LA PLANTA DE PIMIENTO

EFFECTO DE PO212 SOBRE O ESTRÉS POR COBRE NA PLANTA DE PEMENTO

EFFECT OF PO212 ON COPPER STRESS IN PEPPER PLANT

Autor: Ángeles Ayán Álvarez

Directores: Jose Díaz Varela, Néstor Carrillo Barral

Curso 2017/2018

Julio 2018



D. JOSÉ DÍAZ VARELA, PROFESOR TITULAR DE FISIOLÓGÍA VEGETAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, Y D. NÉSTOR CARRILLO BARRAL, PROFESOR CONTRATADO INTERINO DE SUSTITUCIÓN, DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que el presente Trabajo de Fin de Máster presentado por la alumna ÁNGELES AYÁN ÁLVAREZ y titulado

“Efecto de PO212 sobre el estrés por cobre en la planta de pimiento”

“Efecto de PO212 sobre o estrés por cobre na planta de pemento”

“Effect of PO212 on copper stress in pepper plant”

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

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en A Coruña, a 17 de Julio de 2018.

Fdo. José Díaz Varela

Fdo. Néstor Carrillo Barral

ÍNDICE

Resumen / Resumo / Abstract.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Metales pesados.....	4
1.1.1. Metales pesados y medioambiente.....	4
1.1.2. Metales pesados y plantas.....	5
1.1.3. Cobre (Cu).....	7
1.1.4. Efecto del cobre en plantas.....	7
1.2. Pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	8
1.2.1. Producción mundial del pimiento.....	9
1.2.2. Importancia económica a nivel nacional.....	9
1.2.3. Pimiento de Padrón.....	11
1.3. Hongo <i>Penicillium rubens</i>	12
1.3.1. Hábitat de <i>Penicillium</i>	12
1.3.2. Aspectos morfológicos de <i>Penicillium</i>	12
1.3.3. Importancia de <i>Penicillium</i>	12
1.3.4. <i>Penicillium rubens</i> cepa PO212.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
3.1. Obtención de las plantas de pimiento.....	15
3.2. Crecimiento y obtención de conidios de PO212.....	15
3.3. Tratamiento de las plantas con PO212.....	15
3.4. Tratamiento de las plantas con Cu^{2+}	16
3.5. Medidas de peso fresco y obtención de muestras para análisis.....	16
3.6. Análisis de la expresión de CaPOI.....	16
3.7. Medida de la actividad peroxidasa.....	18
3.8. Medida de fenoles solubles totales.....	18
3.9. Medida de ligninas totales.....	19
3.10. Análisis estadísticos.....	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Efecto del cobre y PO212 sobre el crecimiento de las plantas.....	21
4.2. Análisis de expresión de CaPOI.....	23
4.3. Análisis de actividad peroxidasa.....	23
4.4. Análisis de fenoles solubles totales.....	24
4.5. Análisis de ligninas totales.....	25
5. DISCUSIÓN.....	27

6. <i>CONCLUSIONES / CONCLUSIONS</i>	30
7. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	31

RESUMEN

El aumento indiscriminado de la contaminación ambiental en el aire, suelos y agua, a causa de la liberación de metales pesados, tiene una fuerte repercusión en la productividad de los cultivos. Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa frente a la toxicidad de estos metales. En el presente estudio esto se hace patente en el incremento de la concentración de lignina y fenoles y de la actividad de peroxidasa en plantas de pimiento estresadas por cobre. En este trabajo también se ensayó la capacidad del hongo *Penicillium rubens* PO212, conocido como agente de control biológico de diversas enfermedades en plantas hortícolas, para proteger a la planta de pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L.) frente a este estrés por cobre. Los resultados obtenidos indican que PO212 no es capaz de proteger las plantas de pimiento frente al cobre.

RESUMO

O aumento indiscriminado da contaminación ambiental no aire, solos e auga, provocada pola liberación de metais pesados, ten unha forte repercusión na produtividade dos cultivos. No presente estudo, isto faise patente no incremento da concentración de ligninas e fenóis e da actividade peroxidasa nas plantas de pemento estresadas por cobre. Neste traballo tamén se estudou a capacidade do fungo *Penicillium rubens* PO212, coñecido como axente de control biolóxico de numerosas enfermidades en plantas hortícolas, para protexer-a planta de pemento de Padrón (*Capsicum annuum* L.) fronte a este estrés xerado polo cobre. Os resultados obtidos amosan que PO212 non é capaz de protexer as plantas de pemento fronte ó cobre.

ABSTRACT

The indiscriminate increase of environmental pollution in air, soil and water, due to the release of heavy metals, has a strong impact on crop productivity. Plants have developed defense mechanisms against the toxicity of these metals. In the present study, this is evident in the increase in the concentration of lignin and phenols and in peroxidase activity in pepper plants stressed by copper. This work also tested the ability of the fungus *Penicillium rubens* PO212, known as a biological control agent of various diseases in horticultural plants, to protect the Padron pepper plant (*Capsicum annuum* L.) against this copper stress. The results obtained indicate that PO212 is not able to protect pepper plants against copper.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico y la explotación masiva e indiscriminada de los recursos naturales, supone la liberación de gran cantidad de contaminantes a la biosfera a causa de la perturbación en los ciclos biogeoquímicos elementales (Cañizares-Villanueva, 2000). La contaminación ambiental es una de las principales preocupaciones a nivel mundial ya que afecta a los recursos naturales básicos: el aire, los suelos y el agua, por lo que muchos gobiernos y organismos internacionales han puesto en marcha planes para reducir el consumo innecesario de dichos recursos y la cantidad de residuos generados. Entre los contaminantes más abundantes y perjudiciales se encuentran metales pesados, elementos radiactivos y sustancias orgánicas como, fertilizantes, plaguicidas, lodos de aguas residuales, hidrocarburos tanto halogenados como no halogenados, dibenzofurano (DBF), bifenilos policlorados (PCBs), etc. cuyo riesgo radica en su persistencia y bioacumulación, la creación de nuevas asociaciones químicas y en su capacidad de reacción o toxicidad creciente (Pérez Palacios, 2015).

1.1.METALES PESADOS

1.1.1 Metales pesados y medioambiente

Los metales pesados están presentes en el suelo como componentes propios del mismo, pero su concentración ha aumentado debido a actividades antropogénicas. Estas actividades son principalmente industriales, pero también contribuyen la agricultura y la eliminación de residuos (Cañizares-Villanueva, 2000). En general, los metales pesados pueden incorporarse al suelo por cuatro vías diferentes: la primera, quedando retenidos en el suelo, disueltos u ocupando sitios de intercambio; la segunda, siendo adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos del suelo de forma específica; la tercera, estando asociados a la materia orgánica del suelo y por último a causa de la precipitación en forma de sólidos puros o mixtos. Además, también pueden ser absorbidos por las plantas e incorporarse a las cadenas tróficas; pasar a la atmósfera por volatilización o ser movilizados a aguas superficiales o subterráneas. Esto resulta importante ya que su toxicidad no depende sólo de su concentración, sino también de su movilidad y reacción con otros compuestos (Prieto Méndez *et al.*, 2009).

Algunos metales pesados como el Cu, Se, Zn son considerados oligoelementos esenciales necesarios en casi todos los procesos fisiológicos para mantener un correcto metabolismo en los seres vivos, sin embargo, en concentraciones más altas resultan extremadamente tóxicos. El As, Pb, Cd y Hg son considerados los metales más tóxicos por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) (Shahid *et al.*, 2015).

Esta contaminación influye en gran medida en la calidad ambiental y reduce la productividad de los cultivos, al causar problemas en los animales y plantas que habitan en la zona contaminada interfiriendo con la fotosíntesis, la captación de agua y minerales y el metabolismo. En casos extremos causan la muerte del organismo lo que conlleva, asimismo, pérdidas económicas a nivel mundial por parte del sector agrario (Shahid *et al.*, 2015).

En los suelos agrícolas se han llegado a detectar concentraciones de Cr, Ni, Cu, Zn y Pb superiores a los valores considerados “normales” en suelos (*Tabla 1*).

Tabla 1. Concentraciones normales y anómalas de algunos elementos traza en suelos y valores en suelos agrícolas, adaptado de Belmonte Serrato *et al.*, 2010 y de Bowie & Thornton, 1985.

Elemento	Rango normal (mg/kg)	Valores anómalos (mg/kg)
As	5-40	>2.500
Cu	60	>2.000
Ni	2-100	>8.000
Pb	10-150	≥10.000
Zn	25-200	≥10.000

1.1.2. Metales pesados y plantas

En el caso de las plantas, los metales pesados se incorporan en la cadena alimentaria y luego se acumulan dependiendo del movimiento de los metales desde la solución del suelo a la raíz de la planta (Prieto Méndez *et al.*, 2009).

Su peligro radica en la tendencia a bioacumularse en diferentes cultivos. La bioacumulación significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo vivo en un determinado periodo de tiempo, comparada con la concentración habitual de dicho producto químico en el alimento o en el ambiente, y estas

concentraciones aumentan a medida que ascendemos en la cadena trófica (Prieto Méndez *et al.*, 2009).

La toxicidad en las células varía en función de su estado de oxidación: redox activos (Fe, Cu, Cr y Co) que alteran el equilibrio redox estimulando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la reacción de Fenton y Haber-Weiss; y los redox inactivos (Cd, Zn, Ni, Al, As) que interaccionan con el sistema de defensa antioxidante, bien interrumpiendo la cadena de transporte de electrones o bien produciendo peroxidación lipídica (Yadav, 2010).

El crecimiento atrofiado, la necrosis, la epinastia foliar, la clorosis y la decoloración rojoparrón son síntomas visibles de plantas que crecen en ambientes con exceso de metales pesados (Díaz *et al.*, 2001). Además, a nivel molecular, pueden inactivar enzimas y proteínas, bloquear y sustituir metales esenciales de grupos funcionales en biomoléculas e incluso alterar la distribución de la membrana plasmática (Yadav, 2010).

Frente a estos daños, las plantas desarrollan mecanismos de defensa para frenar la toxicidad de los metales pesados, entre los que se incluyen (Chmielowska *et al.*, 2010; Pérez Palacios, 2015):

- Retención de los metales pesados en la membrana plasmática.
- Bloqueo de entrada y transporte de los mismos por cambios en el pH de la rizosfera, almacenamiento en vacuolas o inclusión en espacio apoplástico.
- Síntesis de quelantes de metales pesados como fitoquelatinas y metalotioneínas que actúan como detoxificadores.
- Sobreexpresión de proteínas de choque térmico (HSP) que protegen las proteínas frente al estrés.
- Biosíntesis de prolina que actúa como una chaperona protegiendo la integridad de proteínas y potenciando la actividad de diferentes enzimas, además de poder presentar poder antioxidante eliminando ROS.
- Biosíntesis de poliaminas que pueden actuar como quelantes de metales y proteger las células frente al daño oxidativo producido por los mismos.
- Biosíntesis de polifenoles como flavonoides y taninos asociados al sistema de defensa de la planta con acción antioxidante.
- Inducción de mecanismos que contrarresten los efectos dañinos de ROS como, la producción de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD),

ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT). Además, existen otros componentes no enzimáticos también relacionados con el sistema antioxidante de defensa como el ascorbato (AsA) y el glutatión (GSH) cuyo gran poder reside en la participación en el ciclo de AsA-GSHT.

1.1.3. Cobre (Cu)

El Cu es un micronutriente de las plantas que juega un papel importante en la asimilación de CO₂, la síntesis de ATP y la formación de la pared celular (Yadav, 2010; Pérez Palacios, 2015). Es también un componente esencial de diversas proteínas como la plastocianina del sistema fotosintético y la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria de transporte de electrones (Yadav, 2010).

Es un metal extremadamente reactivo y dañino para las células por lo que sus niveles deben estar muy controlados. La media de contenido de Cu en tejidos es de 10 µg/g en peso seco, aunque el contenido crítico en un medio de cultivo es de entre 10⁻⁶ y 10⁻⁹ M. Las concentraciones elevadas pueden tener efectos devastadores para las células, inhibir el crecimiento e interrumpir procesos importantes como la fotosíntesis y la respiración. Una exposición prolongada a altos niveles de Cu puede tener efecto en la estructura de los cloroplastos y en el contenido de clorofila. Además, el Cu es un metal redox muy potente que produce un estrés oxidativo muy fuerte por la formación de OH, O₂⁻ y H₂O₂ en las reacciones de Haber-Weiss y de Fenton. Otros efectos son los daños producidos al alterar la conformación del ADN (Yadav, 2010).

Además, el Cu actúa como un biocida uniéndose a diversos constituyentes orgánicos del citoplasma celular (grupos fosfato, sulfhidrilo y amina) e interfiriendo con la actividad enzimática (piruvato deshidrogenasa, α-cetoglutarato deshidrogenasa) asociados con la producción de energía (Ross, 1994). Es un componente habitual en muchos pesticidas, pero también juega un papel importante en la resistencia a enfermedades debido a su participación en muchas funciones fisiológicas (Chmielowska *et al.*, 2010).

1.1.4. Efecto del cobre en plantas

Uno de los componentes principales que protege a las plantas es la lignina, que es sintetizada por peroxidasas de alcoholes cinamílicos. Las peroxidasas y la lignificación se inducen tanto por el estrés por metales pesados como por la infección por patógenos,

al igual que la acumulación de metabolitos secundarios que incluyen compuestos fenólicos y terpenoides. La acumulación de lignina se ha relacionado con peroxidasas básicas e influye en el crecimiento de la planta, ya que disminuye la plasticidad de la pared celular y lleva a la reducción de la elongación celular y, por lo tanto, al enanismo de las plantas estresadas (Chmielowska *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2001). No obstante, no se puede descartar que las peroxidasas ácidas pueden estar también implicadas en la respuesta de lignificación (Chmielowska *et al.*, 2010).

La acumulación de Cu en el hipocótilo de las plantas de pimiento induce la síntesis de la enzima shikimato deshidrogenasa (SKDH). Esta enzima cataliza uno de los primeros pasos de la ruta de síntesis de la lignina. La inducción de SKDH en hipocótilos de pimiento bajo estrés, va acompañada por la acumulación de lignina y compuestos fenólicos, tal vez precursores de lignina, que están involucrados en la defensa de la planta. Esto a su vez, está relacionado con la inducción de peroxidasas (Díaz *et al.*, 2001).

Se sabe que los genes de peroxidasas *CaPOA1*, *CaPOT1* y *CaPO1* regulan el nivel de defensa del pimiento frente al ataque de patógenos por la acumulación de H₂O₂ (Do *et al.*, 2003). *CaPO1* codifica para una peroxidasa básica que ha sido relacionada con el proceso de lignificación. Otro gen de peroxidasa de pimiento, *CaPO2*, también ha sido relacionado con dicha respuesta frente a infecciones (Chmielowska *et al.*, 2010).

1.2. PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.)

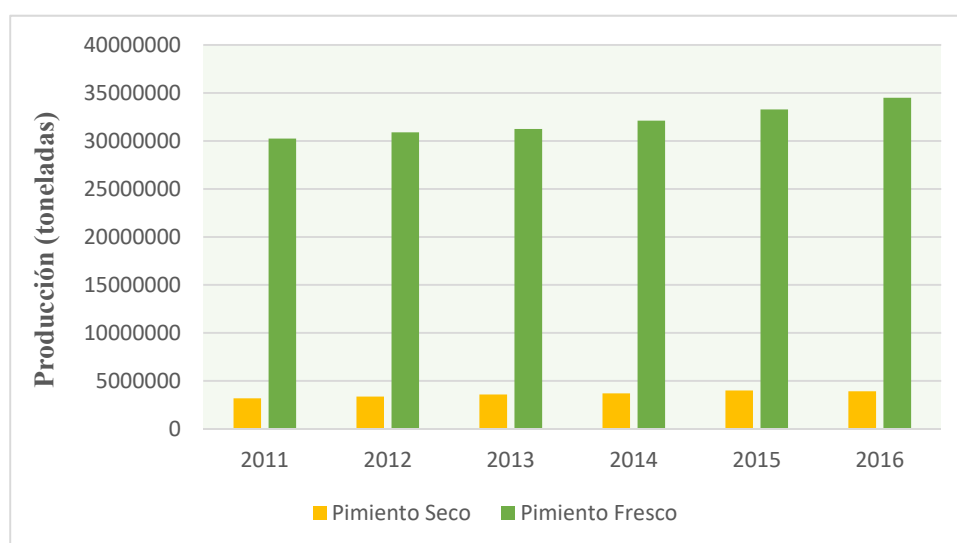
El género *Capsicum* es uno de los grupos de solanáceas más cultivado en el mundo, especialmente por los países de área mediterránea, y una de las hortalizas de mayor consumo en España. Es originaria de Centroamérica y fue introducida en España en el año 1493. Desde ahí fue extendida a toda Europa (Reche Mármol, 2010; Po *et al.*, 2018).

El fruto de *Capsicum annuum* es consumido tanto en sus formas frescas como secas, siendo el origen de una especia ampliamente consumida, el pimentón. Su interés nutricional radica en el alto contenido en vitaminas C y A, ácidos fenólicos, flavonoides y su actividad antioxidante (Po *et al.*, 2018).

1.2.1. Producción mundial del pimiento

Su producción mundial aumentó en los últimos años, debido al incremento de importaciones que implica un mayor consumo de pimiento (*Figura 1*). La producción de chiles y pimientos frescos es diez veces más elevada que la producción de pimiento seco o pimentón según los datos de la FAO, sin embargo, ambas variedades han visto aumentada su producción.

Figura 1: Producción mundial de pimiento fresco y pimiento seco en los años indicados. Fuente: FAO, 2018.



1.2.2. Importancia económica a nivel nacional

España se ha convertido en uno de los mayores proveedores de pimientos en conserva, así como en el principal productor de oleoresina de pimentón (Po *et al.*, 2018).

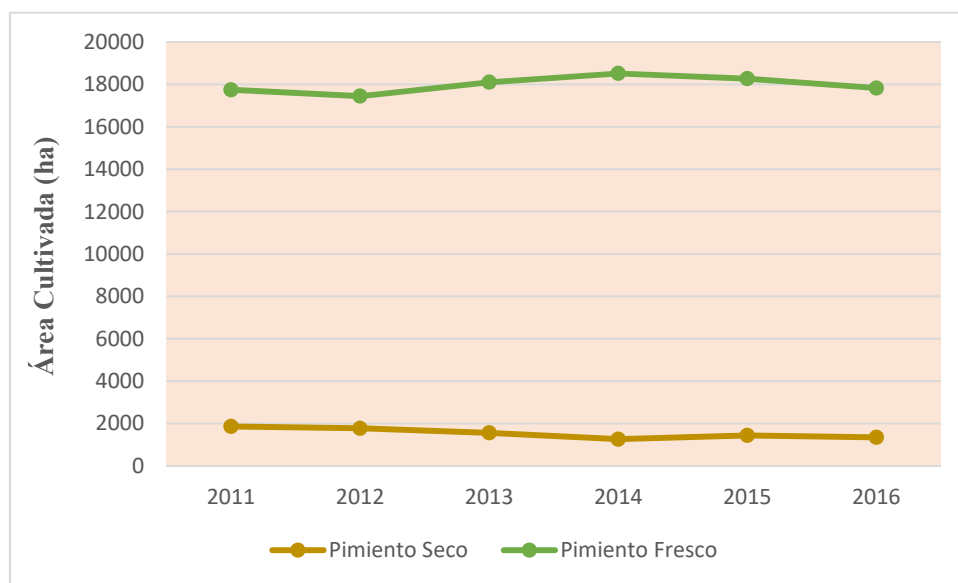
En España el cultivo de pimiento está presente en todas las comarcas agrarias, ya sea para consumo en fresco o para procesado industrial debido a la diversidad de variedades, formas, colores y destino; para consumo en fresco se localiza, principalmente, en Almería, Murcia, Málaga, Granada, Galicia y Región Valenciana, destacando las producciones de las provincias gallegas con sus variedades autóctonas.

Su adaptación al clima del invernadero permite su cultivo durante todo el año, así como su comercio en cualquier mercado nacional o internacional, ya que España es uno de los

principales países exportadores de frutas y hortalizas de la Unión Europea (Reche Mármol, 2010).

En la *Figura 2* se muestra la evolución del área cultivada de pimiento en España cuyos valores han sido muy estables, alrededor de las 17.000/18.000 ha.

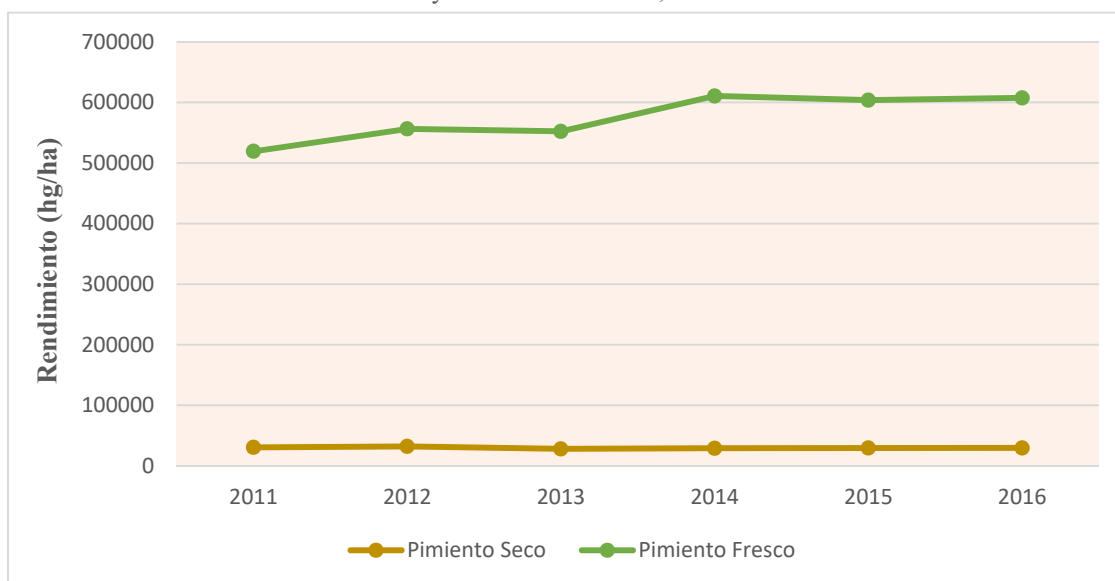
Figura 2: Evolución del área cultivada de pimiento seco y pimiento fresco en España entre los años 2011 y 2016. Fuente: FAO, 2018.



El rendimiento de la planta del pimiento depende del número y peso de los frutos, del tipo de pimiento a cultivar y de la fertilidad del suelo, la calidad del agua de riego, la densidad de plantación, las condiciones ambientales y la experiencia del agricultor (Reche Mármol, 2010).

Los rendimientos en el ámbito español, han ido incrementándose con los años (Figura 3).

Figura 3: Evolución del rendimiento de pimiento seco y pimiento fresco en España entre los años 2011 y 2016. Fuente: FAO, 2018.



Además, los precios medios percibidos por los agricultores también se han ido incrementando en el transcurso de los años, llegando a dispararse en momentos puntuales (Reche Mármol, 2010).

1.2.3. Pimiento de Padrón

El pimiento de Padrón es un ecotipo local cultivado en la localidad vecina de Padrón (A Coruña), que parece tener origen en unas semillas traídas a Galicia por los monjes Franciscanos en el siglo XVII. Su aclimatación al suelo y clima de Galicia fue rápida, extendiéndose el cultivo durante el siglo XVIII y considerándose habitual en la dieta desde entonces. El fruto es semicartilaginoso, de color verde en estado de inmadurez y rojo en estado maduro, colgante con talla y forma variable dependiendo del grado de desarrollo y de las condiciones de cultivo (Rivera Martínez *et al.*, 2003).

Hoy en día, esta variedad es altamente apreciada por los consumidores y por ello se cultiva en varias zonas, tanto dentro como fuera de Galicia (Lumbreras Iglesias, 2017).

1.3. HONGO *Penicillium rubens*

1.3.1. Hábitat y taxonomía de *Penicillium*

Hay más de 200 especies de *Penicillium*. Son hongos filamentosos incoloros que se encuentran muy comúnmente en el suelo, en la vegetación en descomposición y en el compost o en la madera, alimentos secos, frutas frescas y hortalizas. También se encuentran creciendo en materiales de construcción, en ambientes dañados por el agua, así como en el aire interior y el polvo de casa (Institut National de Santé Publique du Quebec, 2016).

1.3.2. Aspectos morfológicos de *Penicillium*

Las colonias generalmente crecen rápido, en tonos verdes, blancos y ocasionalmente de otros colores, que consisten en un denso micelio de conidióforos. Es conocido como el primer productor de antibióticos descubierto, aunque no todas las especies del género sintetizan penicilina. No necesita mucha humedad para crecer, por lo que puede hacerlo con muy poco sustrato. Sus esporas pueden prevalecer bastante tiempo en el aire. (Anónimo, 2010).

1.3.3. Importancia de *Penicillium*

Penicillium juega un papel importante como agente de remediación ambiental natural en el ecosistema (Lúcia Leitão, 2009). La mayoría de las especies del género *Penicillium* destacan, principalmente, porque son hongos de almacén y los principales causantes de las “podredumbres azules o verdes” en cítricos, frutos de hueso y de pepita, uvas, melones, higos, cebollas, y hortalizas en general (Roselló Caselles, 2003).

Las especies de *Penicillium* demostraron ser capaces de crecer a altas concentraciones de sal y en su ausencia. También procesan alta resistencia a los metales pesados y son eficientes en la degradación de hidrocarburos, por lo que podrían usarse como agentes para la reducción de estos contaminantes tanto en condiciones hipersalinas como hiposalinas (Lúcia Leitão, 2009).

1.3.4. *Penicillium rubens* cepa PO212

Penicillium rubens Currie et Thom es una de las especies de mayor distribución de todos los *Penicillium*. La cepa 212 de *P. rubens* (PO212) es un buen agente de control biológico de varias enfermedades hortícolas producidas por patógenos fúngicos, que producen grandes pérdidas económicas y una buena opción como sustituto de plaguicidas, por su eficacia en el control de diversas enfermedades en plantas hortícolas (Villarino *et al.*, 2015). Esto se debe a que es ecológicamente competitivo y no supone un riesgo para otros microorganismos fúngicos no-diana presentes en el lugar de aplicación (Vázquez García, 2013).

PO212 es un hongo endófito capaz de inducir resistencia frente a la marchitez vascular causada por *Verticillium spp.* y *Fusarium spp.* en plantas de tomate, promoviendo su crecimiento, al suprimir cambios morfológicos ocasionados por dichos patógenos (Larena *et al.*, 2003a; Larena *et al.*, 2003b). Además, es capaz de resistir altas concentraciones de metales pesados e incluso secuestrarlos para reducir su toxicidad (Lucía Leitão, 2009).

Su modo de acción comprende la inducción de resistencia en las plantas huéspedes sin descartar la competencia por espacio y/o nutrientes. Se ha comprobado su eficacia contra ciertos patógenos, pero hasta el momento no se sabe si la estimulación de defensas funciona también contra otros estreses como, por ejemplo, los metales pesados. Por ello, resulta interesante investigar si *P. rubens* PO212 es capaz de reducir los efectos dañinos de un metal pesado en plantas de pimiento de Padrón y promover su crecimiento, como se ha visto recientemente en plantas de tomate estresadas por patógenos.

2. OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo consisten en:

1. Ensayar la capacidad del hongo PO212 para proteger la planta de pimiento frente al estrés ocasionado por el cobre.
2. Observar la respuesta fisiológica de la planta de pimiento a ambos factores por separado y en conjunto.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención de las plantas de pimiento

Se sembró 1 g de semillas de pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L.) en semilleros con vermiculita (*Figura 4*) y el riego se realizó con una solución nutritiva compuesta por 6 mM KNO₃, 4 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM NH₄H₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 50 μM KCl, 25 μM H₃BO₃, 2 μM MnSO₄, 2 μM ZnSO₄, 0,5 μM CuSO₄, 0,5 μM H₂MoO₄, 20 μM EDTA y 20 μM Fe(NH₄)₂(SO₄) (Hoagland y Arnon, 1950).

Se cultivaron en cámara durante 2 semanas bajo un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y una temperatura de 25°C diurna y 18°C nocturna.

Figura 4: Semillas de *Capsicum annuum* L. colocadas equidistantemente en el semillero con vermiculita.

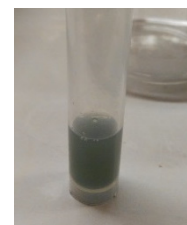


3.2. Crecimiento y obtención de conidios de PO212

El cultivo de PO212 se realizó en placas Petri con medio PDA (Patata Dextrosa Agar). Las condiciones de crecimiento fueron 23°C en oscuridad.

Tras 2 semanas de cultivo, se procedió a la obtención de los conidios (*Figura 5*). Para ello, se añadieron 10 ml de solución nutritiva estéril a la placa Petri con PO212 ya esporulado. Con ayuda del asa de digralsky se raspó la superficie de la placa para obtener una suspensión de conidios. Se recogió la suspensión y se filtró mediante lana de vidrio para eliminar restos de micelio. Se centrifugó durante 5 minutos a 1500 x g. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los conidios en 1 ml de solución nutritiva estéril. Seguidamente se realizó un recuento de los conidios con ayuda de una cámara Neubauer y un microscopio. Finalmente se preparó una suspensión con una concentración de 10⁶ conidios/ml en solución nutritiva estéril para tratar las plantas.

Figura 5: Suspensión de conidios.



3.3. Tratamiento de las plantas con PO212

Eliminando previamente los restos de vermiculita de la raíz, se sumergieron las raíces de 20 plantas en solución nutritiva estéril (tratamiento Control), y las raíces de otras 20

plantas en una suspensión de conidios de PO212 de concentración 10^6 conidios/ml (tratamiento con PO212).

Las plantas se incubaron con este tratamiento durante 24 horas en la cámara de cultivo, rellenando con solución nutritiva si era necesario.

3.4. Tratamiento de las plantas con Cu^{2+}

Tras el tratamiento con PO212 parte de las plantas se sometieron a tratamiento con Cu. Para ello se utilizó solución nutritiva suplementada con CuSO_4 0,05 mM.

Los cuatro tratamientos finales fueron:

(0) Control: 10 plantas no tratadas con *PO212* se plantaron en un semillero con perlita y se regaron con solución nutritiva.

(P) *Penicillium*: 10 plantas pretratadas con *PO212* se plantaron en un semillero con perlita y se regaron con solución nutritiva.

(Cu) Cobre: 10 plantas no tratadas con *PO212* se plantaron en un semillero con perlita y se regaron con solución nutritiva suplementada con Cu^{2+} .

(P-Cu) *Penicillium* + cobre: 10 plantas pretratadas con *PO212* se plantaron en un semillero con perlita y se regaron con solución nutritiva suplementada con Cu^{2+} .

Se realizaron 4 experimentos independientes.

3.5. Medidas de peso fresco y obtención de muestras para análisis

Tras una semana, se tomaron los pesos frescos de planta entera y de las distintas partes por separado: cotiledones, hipocótilo y raíz. Posteriormente se congelaron en etanol frío y se almacenaron a -80°C .

Los hipocótilos se homogenizaron en un mortero con nitrógeno líquido para evitar su descongelación y se separó el polvo obtenido en distintas alícuotas que se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

3.6. Análisis de la expresión de *CaPOI*

Para cada tratamiento se extrajo el ARN total de una alícuota de 60 mg de muestras congeladas de hipocótilos utilizando el kit de EZNA® Plant RNA de Omega Biotek, de

acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en el uso de columnas de afinidad que retienen específicamente el ARN.

Se midió la concentración de ARN en un espectrofotómetro en base a su absorbancia a 260 nm, y se comprobó la calidad de la extracción en base a la ratio de absorbancia 260/280 nm.

A partir del ARN extraído se realizó la síntesis de su correspondiente ADN complementario (ADNc) utilizando el kit iScript cDNA Synthesis Kit de Biorad, y siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el ADNc obtenido se analizó la expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando un Biorad iCycle™iQ System. Este último paso fue realizado por la Dra. M.^a Fernanda Rodríguez Fariña de la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo a Investigación de la UDC. Se analizó la expresión génica de una peroxidasa (*CaPO1*) utilizando como gen de referencia el gen de la actina (*CaACT*). Los cebadores utilizados para la amplificación se indican en la *Tabla 2*.

Tabla 2: Cebadores empleados en los estudios de expresión génica por qPCR en tiempo real.

Gen	Nº acceso	Referencia	Nombre	Secuencia	Amplión
<i>CaPO1</i>	AF442386	García <i>et al.</i> (2015)	<i>CaPO1 FW</i>	5' ACACTGGAAGCGTGAACAAT 3'	333 pb
			<i>CaPO1 RV</i>	5' CAGCTTGCGCTAACATGAAC 3'	
<i>CaACT</i>	AY572427	Silvar <i>et al.</i> (2008)	<i>CaACT FW</i>	5'ATCCCTCCACCTCTTCACTCTC3'	128 pb
			<i>CaACT RV</i>	5'GCCTTAACCATTCTGTTCCATTATC3'	

Las condiciones en las que se desarrolló la qPCR fueron 2 min. de desnaturalización a 95°C seguida de 40 ciclos de amplificación (cada ciclo consta de 20 s a 95°C, 25 s a 58°C y 50 s a 72°C).

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

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

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

3.7. Medida de la actividad peroxidasa

Las alícuotas de los hipocótilos (150 mg) se resuspendieron en 2 ml de tampón Tris HCl 50 mM + KCl 1M pH 7,5 y se les añadieron 7,5 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Se centrifugaron a 4 °C, 12857 x g durante 20 min y se determinó el volumen del sobrenadante recuperado en cada caso.

Para medir la actividad enzimática, empleamos 10 µl de muestra, 930 µl de Tris HCl 50 mM pH 7,5, 50 µl de H₂O₂ 6,6 mM y 10 µl de 4-metoxinaftol 100 mM. Se midió el cambio de absorbancia a 593 nm a lo largo de 3 min. La actividad enzimática se expresó en U/ g peso fresco.

3.8. Medida de fenoles solubles totales

Las alícuotas (500-700 mg) se resuspendieron en metanol 80%. Se incubaron a 70°C durante 15 min, luego se centrifugaron a 1500 x g 10 min. Se recogió el sobrenadante en un tubo graduado. El precipitado se resuspendió en otros 5 ml de metanol al 80% y se centrifugó a 1500 x g 10 min. Se mezclaron ambos sobrenadantes y se enrasaron a 10 ml con metanol 80%. Esto constituyó la muestra para medir el contenido de compuestos fenólicos solubles totales.

El precipitado se conservó en metanol puro hasta su uso para extraer paredes y medir ligninas.

La medida de fenoles se llevó a cabo por el método de Singleton & Rossi (1965). El contenido de los fenoles se calcula a partir de una recta de calibrado con concentraciones conocidas de un ácido fenólico, en este caso el ácido gálico.

Se prepararon tubos eppendorf para las muestras y el blanco (50 µl de metanol 80%). Las muestras contienen 50 µl de la muestra correspondiente, 750 µl de agua destilada y 50 µl de reactivo Folin-Ciocalteu. Se agitaron los tubos y se incubaron durante 3 min a temperatura ambiente. Finalmente, se les añadieron 150 µl de Na₂CO₃ 20% y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 760 nm.

3.9. Medida de ligninas totales

Para la extracción de las paredes celulares se partió del precipitado obtenido tras la extracción de fenoles. Las paredes celulares se extrajeron mediante una modificación de la técnica de Lorences & Zarra (1986) y Díaz & Merino (1998).

Se eliminó el metanol del precipitado por centrifugación a 1500 x g 15 min. Se homogeneizó en 10 ml de agua destilada y se centrifugó a 1500 x g durante 15 min. A continuación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 6 ml de agua destilada. La suspensión se mantuvo 1 hora en agitación. Se repitió el proceso anterior tres veces, omitiendo el paso de la agitación, pero resuspendiendo el último precipitado en 6 ml de una solución de tampón fosfato 0,5 M, pH 7, etanol 5% y proteasa 0,02% preincubada durante 2 horas a 37°C. La suspensión final se incubó 24 horas a 37°C, tras lo cual, se centrifugó a 1500 x g durante 10 minutos. A continuación, se realizaron tres pasos sucesivos de resuspensión con agua destilada y centrifugación, seguidos de otros tres con etanol 95% y dos más con etanol absoluto.

El precipitado final se dejó secar dentro del tubo, para una vez seco, pesar las paredes extraídas.

Para medir la abundancia de lignina, se llevó a cabo el método de Johnson *et al.* (1961) modificado según Fry (1988) y Hatfield *et al.* (1999).

Se mezclaron 3 mg de paredes celulares con 1 ml de mezcla de bromuro acetilo/ácido acético glacial (1:3 v/v) en un tubo cerrado, incubándolos a 50°C durante 2 horas (con agitaciones puntuales), para posteriormente enfriarlos en hielo (5 minutos). Se les añadió una mezcla de 0,9 ml de NaOH 2N y 5 ml de ácido acético glacial. Seguidamente se añadieron 0,1 ml de cloruro de hidroxilamonio 7,5 M, se filtró la solución con lana de vidrio y se enrasó con ácido acético a 10 ml.

Finalmente se procedió a medir la absorbancia a 280 nm. La cantidad de lignina se calcula teniendo en cuenta que una absorbancia de 0,24 se corresponde a una concentración de 10 µg de lignina / ml (Fry, 1988).

3.10. Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos de los datos se empleó el programa STATGRAPHICS Centurion XVII para Windows, realizando diferentes test. Por un lado, se empleó el test de Kruskal-Wallis para la expresión de *CaPOI* y por otro, el test ANOVA de doble vía para los datos de peso fresco, actividad peroxidasa, fenoles y ligninas. El nivel de confianza empleado en los estudios estadísticos fue del 95%.

4. RESULTADOS

4.1. Efecto del cobre y PO212 sobre el crecimiento de las plantas

Los efectos del cobre en las plantas de pimiento fueron visibles a simple vista (*Figura 6*). Las plantas tratadas con cobre presentaron un crecimiento atrofiado y por lo tanto menor tamaño en comparación con las no tratadas. También se observó clorosis y necrosis en cotiledones y tallo y epinastia foliar en las plantas tratadas con cobre. De igual forma, la perlita estaba más limpia en los tratamientos de cobre debido a su acción biocida que evita que crezcan las algas (*Figura 7*). No obstante, no se observaron diferencias claras debidas al tratamiento con PO212.

Figura 6: Plantas de pimiento de cada uno de los tratamientos tras una semana de inoculación: PO212+Cu, Cu, Control y PO212 (*Penicillium rubens* cepa 212). A simple vista son visibles los efectos producidos por el cobre.



Figura 7: Efectos visibles del cobre tras una semana de incubación. **a)** crecimiento atrofiado, necrosis en cotiledones y tallo e inhibición del crecimiento de algas en la perlita en un tratamiento de Cu. **b)** tratamiento control que carece de cobre, en el que podemos observar el crecimiento de algas en la perlita, así como plantas de mayor tamaño.



Se pesaron las plantas de pimiento enteras y cada una de sus partes (cotiledones, hipocótilo y raíz) para cada grupo pasada una semana tras el tratamiento con PO212 y cobre (*Figura 8*).

En el caso del cobre, se observan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% entre los tratamientos que lo presentan (Cu y Cu+PO212), indicados con la letra “A” y los que no lo presentan (control, PO212), indicados con la letra “B” (ANOVA, $p = 0$).

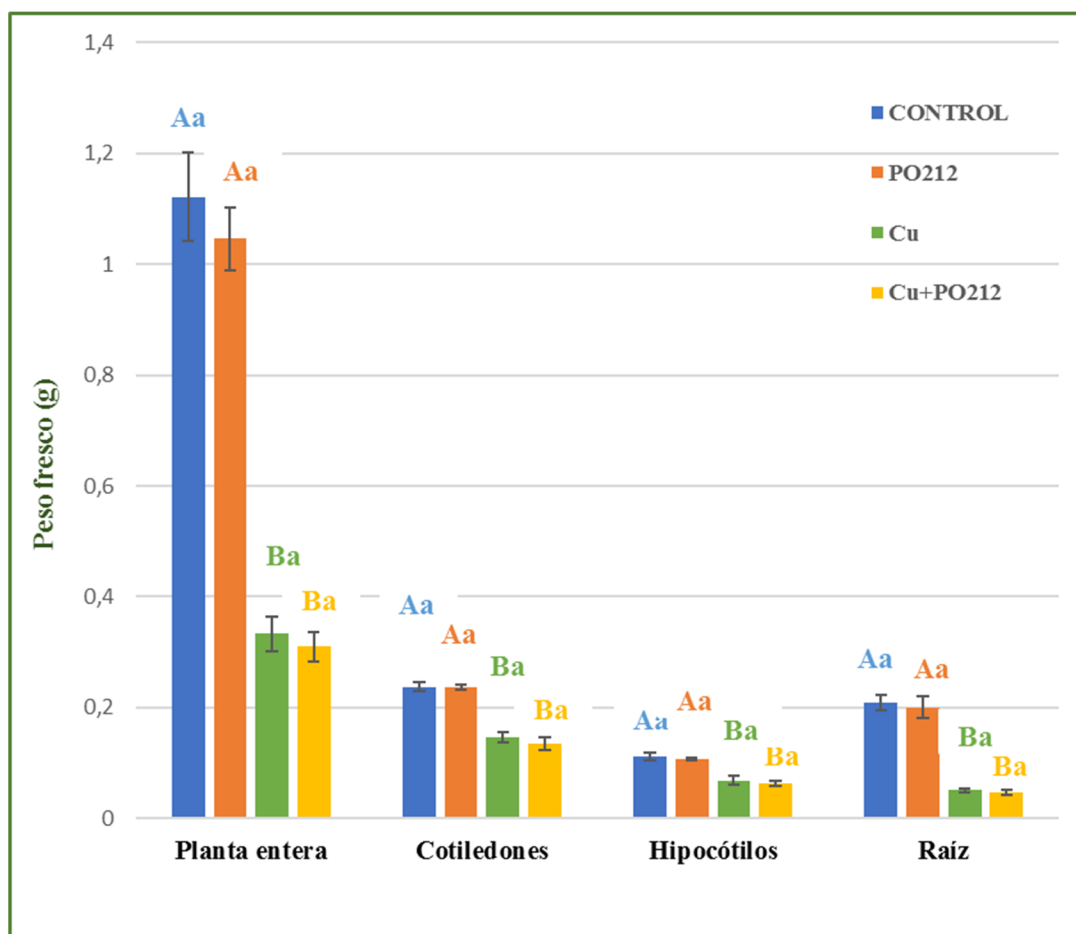


Figura 8: Efecto del cobre y PO212 sobre el peso fresco de la planta y sus órganos. Diferentes letras mayúsculas simbolizan las diferencias significativas ($p < 0,05$) por cobre y las diferentes letras minúsculas las diferencias significativas ($p < 0,05$) por PO212 en base a un test ANOVA. Se muestra la media de cuatro experimentos \pm el error estándar.

Por el contrario, no existen diferencias significativas debidas al tratamiento con PO212 en los diferentes órganos de la planta. No obstante, en el caso de la planta entera, sí que podría considerarse significativo si considerasemos un nivel de confianza del 90% (ANOVA, $p = 0,0923$).

4.2. Análisis de expresión de *CaPO1*

Se realizó una cuantificación del nivel de expresión del gen de la peroxidasa *CaPO1* en los hipocótilos de la planta de pimiento, para comprobar si varía a consecuencia del tratamiento con cobre y PO212.

Los datos obtenidos (*Figura 9*) muestran que el cobre incrementa significativamente la expresión de *CaPO1* (Kruskal-Wallis, $p = 0,0476271$), pero no hay un efecto significativo de PO212.

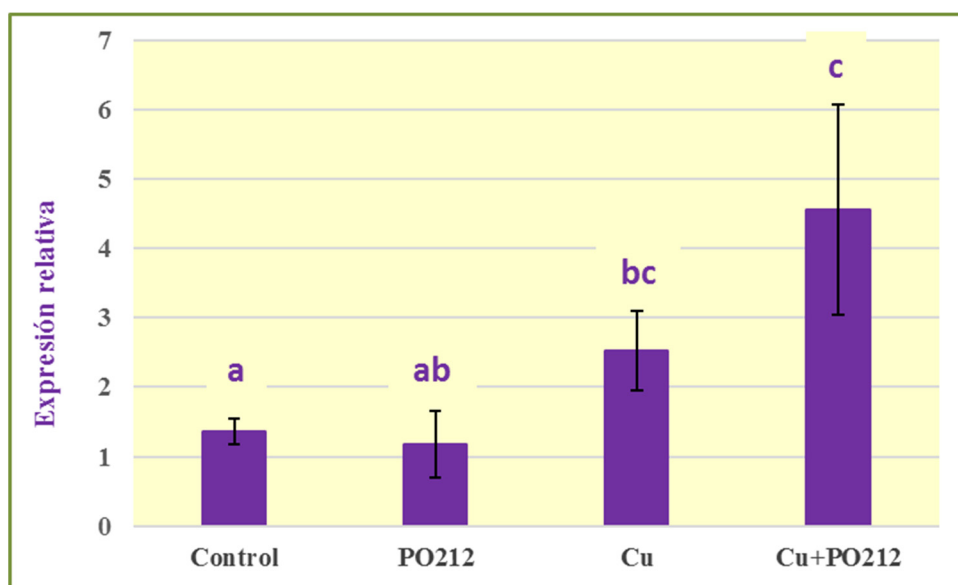


Figura 9: Niveles de expresión del gen *CaPO1* en cada uno de los tratamientos: control, PO212 (*Penicillium rubens* cepa 212), Cu (cobre) y Cu+PO212. Se muestra la media de tres experimentos \pm el error estándar. Si las barras comparten una letra no existen diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 0,05$) entre grupos en base al test de Kruskal-Wallis y al análisis de cajas y bigotes.

4.3. Análisis de la actividad peroxidasa

Se midió la actividad peroxidasa de los hipocótilos de la planta de pimiento en plantas sometidas a los distintos tratamientos (*Figura 10*).

Los datos muestran un aumento significativo de la actividad peroxidasa a causa del cobre (ANOVA, $p= 0,0002$), sin que este efecto se vea afectado al complementarlo con PO212 (ANOVA, $p= 0,4271$).

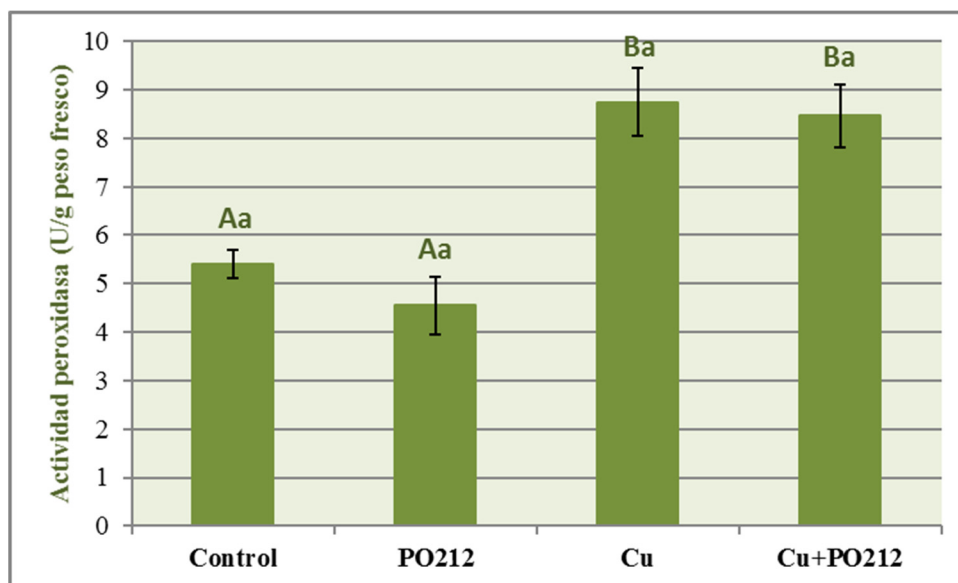


Figura 10: Actividad peroxidasa en hipocótilos de plantas sometidas a los diferentes tratamientos: control, PO212 (*Penicillium rubens* cepa 212), Cu (cobre) y Cu+PO212. Se muestra la media de tres experimentos \pm el error estándar. Las letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($\alpha= 0,05$) según el test ANOVA en el caso del Cu (A/B), pero no en el caso del PO212 (a).

4.4. Análisis de fenoles solubles totales

Se midió la cantidad de fenoles presentes en los hipocótilos de plantas de pimiento bajo diferentes tratamientos con cobre y PO212 (Figura 11).

Los datos muestran un aumento significativo de la cantidad de fenoles solubles en los tratamientos a los que se le añade cobre con respecto a los que no (ANOVA, $p= 0$). Sin embargo, en relación a PO212 no se observa variación significativa (ANOVA, $p= 0,5605$).

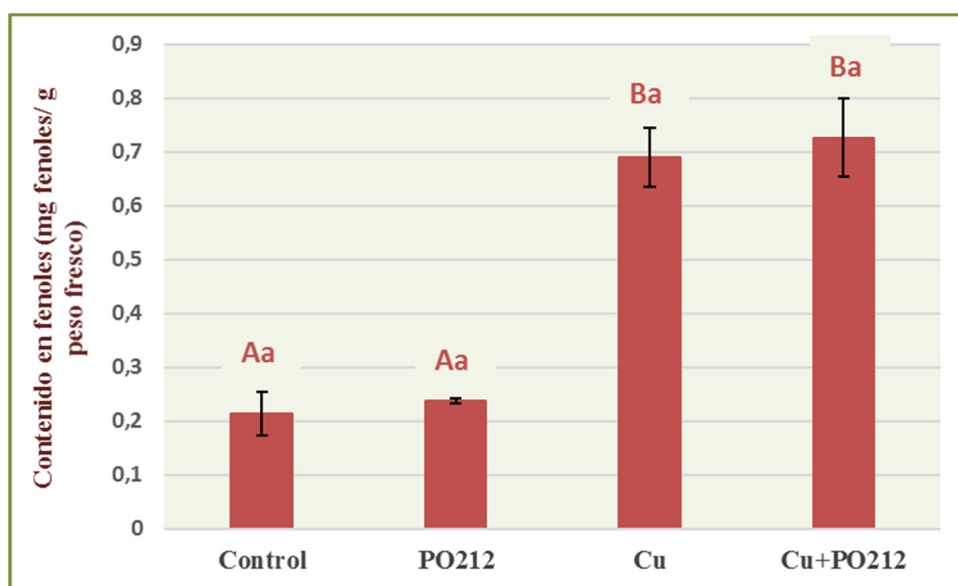


Figura 11: Contenido en fenoles en hipocótilos de plantas sometidas a los distintos tratamientos: control, PO212 (*Penicillium rubens* cepa 212), Cu (cobre) y Cu+PO212. Se muestra la media de tres experimentos \pm el error estándar. Las letras distintas indican que hay diferencias significativas ($\alpha= 0,05$) en el caso del Cu (A/B), pero no en el caso del PO212 (a) según el test ANOVA.

4.5. Análisis de ligninas totales

Se midió el contenido de ligninas totales presente en los hipocótilos de las plantas de pimiento de los cuatro tratamientos (*Figura 12*).

Los datos muestran un aumento significativo de lignina en los tratamientos que llevan cobre con respecto a los que no (ANOVA, $p= 0,0014$). Por el contrario, el tratamiento con PO212 no indujo cambios estadísticamente significativos en el contenido de ligninas (ANOVA, $p= 0,7046$).

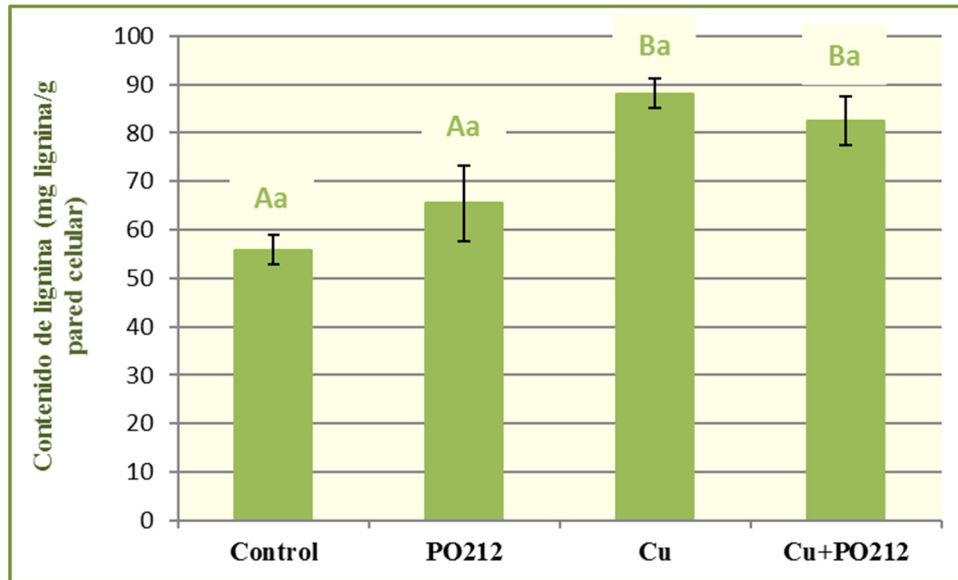


Figura 12: Contenido de lignina en los hipocótilos de plantas sometidas a los distintos tratamientos: control, PO212 (*Penicillium rubens* cepa 212), Cu (cobre) y Cu+PO212. Se muestra la media de tres experimentos \pm el error estándar. Las letras distintas indican que hay diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en el caso del Cu (A/B), pero no en el caso del PO212 (a) según el test ANOVA.

5. DISCUSIÓN

La acumulación excesiva de metales pesados en tejidos vegetales afecta directa o indirectamente a varias funciones fisiológicas en las plantas, y a su vez interfiere en la productividad de los cultivos. Por lo tanto, gran variedad de estudios pretenden encontrar soluciones eficaces y no perjudiciales para combatir los excesos de metales. En este trabajo se observaron los efectos provocados por el cobre en las plantas de pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L.), desde cambios en la morfología visibles a simple vista como son la necrosis en hojas y tallos, la epinastia foliar, la clorosis y el crecimiento atrofiado, hasta modificaciones en procesos fisiológicos. Esto ocurre porque el cobre interfiere con la fisiología de la planta inhibiendo la fotosíntesis, la respiración y la fijación de nitrógeno (Díaz *et al.*, 2001). También aumenta las especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana generando malondialdehído (MDA), oxidación de proteínas e inactivación de enzimas (Anwar Hossain *et al.*, 2011). Este estrés se ve contrarrestado por el glutatión que es un antioxidante que protege a la planta frente al estrés oxidativo (Khan&Lee, 2013). Todos estos efectos provocan un aumento de fenoles, ligninas y actividad peroxidasa, tal como se ha visto en nuestro estudio.

Se sabe que las peroxidasas son un grupo de enzimas involucradas en el metabolismo fenólico y el metabolismo de las ligninas entre otros muchos procesos celulares, y que están inducidas por los estreses abióticos y bióticos, catalizando la reducción de H₂O₂ al tomar electrones de varias moléculas donantes como compuestos fenólicos, precursores de ligninas, auxinas o metabolitos secundarios (Díaz *et al.*, 2001; Passardi *et al.*, 2005). Por lo tanto, el aumento de fenoles y ligninas se puede deber a este incremento en la actividad peroxidasa ya que está directamente relacionada con la deposición de materiales de refuerzo en la pared celular, como la lignina y la suberina, que forman una barrera mecánica frente a agentes patógenos. Al mismo tiempo esta acumulación influye en el proceso de elongación del hipocótilo debido a que la reticulación de los monómeros fenólicos en la formación de suberina y el acoplamiento oxidativo de las unidades de lignina, se ha asociado con la reducción de la extensión celular y crecimiento (Silvar *et al.*, 2007; Passardi *et al.*, 2005). Además, la síntesis de etileno inducida por el Cu puede aumentar la senescencia, inhibir el crecimiento celular y aumentar la rigidez de la pared celular mediante lignificación (Anwar Hossain *et al.*, 2011).

También estudiamos la expresión del gen *CaPOI*, que codifica una peroxidasa implicada en la defensa de las plantas, para comprobar su relación con el aumento de actividad peroxidasa puesto que la expresión de este gen puede estar relacionada con respuestas de defensa asociadas a ROS y a la acumulación de H₂O₂ (Do *et al.*, 2002).

La expresión de *CaPOI* también se vio incrementada a causa del estrés provocado por el cobre en *C. annuum*, pero el aumento no ha tenido una tendencia clara en relación a la actividad peroxidasa lo cual puede deberse a la expresión de diferentes conjuntos de genes. La expresión de *CaPOI* se induce en respuesta al cobre en plantas de pimiento inoculadas con *Verticillium dahliae* Kleb, a la vez que el cobre reduce los síntomas de verticilosis (Chmielowska *et al.*, 2010). En plantas de pimiento infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, la expresión de *CaPOI*, *CaPOAI* y *CaPOTI* también aumenta (Do *et al.*, 2002). Igualmente, *CaPOI* aumenta su expresión en respuesta a *Phytophthora capsici* en *Capsicum annuum*, particularmente en los genotipos resistentes a ese patógeno (Silvar *et al.*, 2008).

Además, también analizamos el efecto del *Penicillium rubens* cepa 212 (PO212) en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) estresadas por cobre, para comprobar si el PO212 inducía algún tipo de resistencia frente a este tipo de estrés, ya que hay numerosos estudios acerca de la capacidad de algunos microorganismos endofíticos para inducir tolerancia al estrés abiótico en plantas y promover el crecimiento de éstas bajo condiciones de estrés (Lata *et al.*, 2018). Se ha demostrado la capacidad de *Penicillium* spp. de inducir resistencia en numerosos estreses causados en plantas, tanto por hongos patógenos, como por metales pesados presentes en los suelos. Este es el caso de PO212 que reduce la marchitez en plantas de tomate ocasionada por los hongos patógenos que invaden el sistema vascular, *Fusarium* y *Verticillium*, suprimiendo los cambios morfológicos provocados por ellos. (Larena *et al.*, 2003 a y b; De Cal *et al.*, 1999). Otros hongos son capaces de mitigar los efectos de patógenos en plantas, como *Trichoderma koningiopsis* Th003 que tiene elevada eficacia frente a *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate o frente a la enfermedad causada por el patógeno fúngico necrótrófico *Botrytis cinerea* en muchas especies de plantas (Jaimes Suárez *et al.*, 2009; Vos *et al.*, 2015). Incluso muchas especies de *Bacillus* también han mostrado ser efectivas contra una amplia gama de patógenos en plantas, como *Paenibacillus ehimensis* KWN38 que también mejora la marchitez por *Fusarium* en tomate, ya que se trata de una cepa bacteriana antifúngica (Shafi *et al.*, 2017; Naing *et al.*, 2015).

En el caso de los metales pesados, *Penicillium funiculosum* LHL06 produce giberelinas bioactivas, que contribuyen a paliar los efectos adversos de metales tóxicos como Cu y Cd, viéndose incrementada la biomasa de las plantas de soja, así como la cantidad de clorofila, carotenoides y proteínas para contrarrestar el estrés (Khan & Lee, 2013). Además, el micelio de otras especies de *Penicillium* puede acumular metales pesados como *P. digitatum* que acumula uranio o *P. simplicissimum* que adsorbe Zn^{+2} , Cd^{+2} y Pb^{+2} y produce ácido cítrico. *P. janthinellum* es capaz de reducir la toxicidad del aluminio y *P. canescence* es capaz de eliminar los iones Cd, Pb, Hg y As de las soluciones acuosas por biosorción (Lúcia Leitão, 2009).

A pesar de todos los estudios mencionados anteriormente, que demuestran una clara respuesta de mejora al inocular *Penicillium* o algún otro hongo endófito en plantas afectadas por patógenos o metales tóxicos, en nuestro caso no se pudo observar una inducción de resistencia por PO212 frente al cobre en plantas de pimiento *C. annuum*. Probablemente con un estudio más profundo y prolongado en el tiempo, o cambiando las condiciones de aplicación, podríamos llegar a obtener una respuesta por parte de PO212 al estrés del Cu, ya que en el análisis de ligninas puede verse una cierta tendencia de respuesta diferencial. De hecho, el nivel de resistencia alcanzado por una planta a un estrés dado puede depender del grado de coordinación de las diferentes estrategias de defensa y la rapidez de la respuesta global (Silvar *et al.*, 2008).

Otra posibilidad sería el estudio de hongos endófitos que sean eficaces para atenuar o inhibir los efectos de metales pesados específicamente en *C. annuum*, ya que hay otros ejemplos de hongos capaces de reducir la toxicidad de metales pesados en diferentes plantas. Tales son los casos de *Neotyphodium spp.* en *Festuca arundinacea* que es capaz de acumular cobre, *Paecilomyces formosus* LHL10 que mejora significativamente el crecimiento en la planta de soja (*Glycine max*) en suelos contaminados por Ni, *Exophiala pisciphila* H93 (hongo asociado a la raíz,) que mejora la respuesta fisiológica del maíz (*Zea mays*) bajo el estrés por Cd y el endófito *Chaetomium globosum* que induce resistencia al cobre en plántulas de maíz (Malinowski *et al.*, 2004; Bilal *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016; Abou Alhamed *et al.*, 2012).

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de nuestro estudio son:

- El tratamiento con PO212 de las plantas de pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L.) no induce resistencia frente al estrés ocasionado por el cobre.
- El estrés ocasionado por el cobre provoca efectos visibles a simple vista como son el crecimiento atrofiado, la clorosis y necrosis en cotiledones y tallo y la epinastia foliar. A nivel fisiológico provoca incremento de la actividad peroxidasa, de la expresión de *CaPOI* y del contenido en ligninas y fenoles en los hipocótilos de *Capsicum annuum*. No obstante, PO212 no afecta a estos parámetros fisiológicos en relación al estrés por cobre.

CONCLUSIONS

The conclusions of our study are:

- The treatment with PO212 of the Padron pepper plants (*Capsicum annuum* L.) does not induce resistance to the stress caused by copper.
- The stress caused by copper causes visible effects to the naked eye such as stunted growth, chlorosis and necrosis in cotyledons and stem and foliar epinasty. At the physiological level, it causes an increase in peroxidase activity, *CaPOI* expression and the content of lignins and phenols in the hypocotyls of *Capsicum annuum*. However, PO212 does not affect these physiological parameters in relation to copper stress.

7. BIBLIOGRAFÍA:

- Abou Alhamed, M.F. & Shebany, Y.M. 2012. Endophytic *Chaetomium globosum* enhances maize seedling copper stress tolerance. *Plant Biology*, 14: 859-863.
- Anónimo. 2010. *Penicillium*. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Penicillium> [Consultado el 18 de junio de 2018].
- Anwar Hossain, M., Piyatida, P., Teixeira da Silva, J.A. & Fujita, M. 2011. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: Central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, 2012: 872875.
- Belmonte Serrato, F., Romero Díaz, A., Alonso Sarría, F., Moreno Brotóns, J. & Rojo López, S. 2010. Afección de suelos agrícolas por metales pesados en áreas limítrofes a explotaciones mineras del sureste de España. *Papeles de Geografía*, 51-52: 45-54.
- Bilal, S., Khan, A.L, Shahzad, R., Asaf, S., Kang, S., & Lee, I. 2017. Endophytic *Paecilomyces formosus* LHL10 augments *Glycine max* L. adaptation to Ni-contamination through affecting endogenous phytohormones and oxidative stress. *Frontiers in Plant Science*, 8: 870.
- Bowie, S.H. & Thornton, I. 1985. *Environmental geochemistry and health*. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland.
- Cañizares-Villanueva, R.O. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42: 131-143.
- Chmielowska, J., Veloso, J., Gutiérrez, 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: 176-182.
- De Cal, A., García-Lepe, R. & Melgarejo, P. 1999. Induced Resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Histological studies of infected tomato stems. *Phytopathology*, 90: 260-268.
- Díaz, J. & Merino, F. 1998. Wound-induced shikimate dehydrogenase and peroxidase related to lignification in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology*, 151: 51-57.

- Díaz, J., Bernal, A., Pomar, F. & Merino, F. 2001. Introduction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*, 161: 179-188.
- Do, H.M., Hong, J.K., Jung, H.W., Kim, S.H, Ham, J.H. & Hwang, B.K. 2003. Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16: 196-205.
- FAO. 2018. FAOSTAT. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> [Consultado el 11 de junio de 2018].
- Fry, S.C. 1988. *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. Wiley. New York, 333.
- 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.
- Hatfield, R.D., Grabber, J., Ralph, J. & Brei, K. 1999. Using the acetylbromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: Some cautionary notes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 628-632.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.J. 1950. *The water-culture method for growing plants without soil*. Berkeley, Calif: University of California, College of Agricultural Experiment Station.
- Institut National de Santé Publique du Quebec. 2016. *Penicillium* spp. Disponible en: <https://www.inspq.qc.ca/es/node/380> [Consultado el 17 de junio de 2018].
- Jaimes Suárez, Y.Y., Moreno Velandia, C.A. & Cotes Prado, A.M. 2009. Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* Th003. *Acta Biologica Colombiana*, 14: 111-120.
- Johnson, D.B., Moore, W.F. & Zank, L.C. 1961. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples, *TAPPI* 44, 793-798.
- Khan, A.L. & Lee, I.J. 2013. Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* growth during copper stress. *BMC Plant Biology*, 13: 86.

- Larena, I., Melgarejo, P. & De Cal, A. 2003a. Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, 151: 600-606.
- Larena, I., Sabuquillo, P., Melgarejo, P. & De Cal, A. 2003b. Biocontrol of *Fusarium* and *Verticillium* wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions. *Journal of Phytopathology*, 151: 507-512.
- Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S.K. & White, J.F. 2018. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Letters in Applied Microbiology*, 66: 268-276.
- Lorences, EP. & Zarra, I. 1986. Hypocotyl growth of *Pinus pinaster* seedlings. Changes in osmotic potential and cell wall composition. *Physiologia Plantarum*, 67: 377-382.
- Lúcia Leitão, A. 2009. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6: 1393-1417.
- Lumbreras Iglesias, P. 2017. Influencia de PO212 y ritmo circadiano sobre la resistencia de pimiento a *Botrytis cinerea*. (Trabajo de Fin de Máster). Universidade da Coruña.
- Malinowski, D.P., Zuo, H., Belesky, D.P. & Alloush, G.A. 2004. Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium spp.* endophytes. *Plant and Soil*, 267: 1-12.
- Naing, K.W., Anees, M., Kim, S.J., Nam, Y., Kim, Y.C. & Kim, K.Y. 2014. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. *Annals of Microbiology*, 64: 55-63.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. & Dunand, C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24: 255-265.
- Pérez Palacios, P. 2015. Biotecnología ambiental: desarrollo de estrategias biotecnológicas para la remediación de metales pesados. Facultad de Farmacia. (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla.
- Pfaffl, M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: 336-343.

- Po, L.G., Siddiq, M. & Shahzad, T. 2018. Chili, peppers, and paprika. En: Siddiq, M. & Uebersax, M.A. (eds). Handbook of vegetables and vegetable processing, volumen II, second edition. Cap 27. Wiley-Blackwell, Estados Unidos.
- Prieto Méndez, J., González Ramírez, C.A., Román Gutiérrez, A.D. & Prieto García, F. 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 10: 29-44.
- Reche Mármol, J. 2010. Cultivo del pimiento dulce en invernadero. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla.
- Rivera Martínez, A., Andrés Ares, J.L., Rodríguez Bao, J.M & Fernández Paz, J. 2003. Pimientos autóctonos de Galicia: Caracterización morfológica y tolerancia frente a *Phytophthora capsici*. XXXIII Seminario de Técnicos y Especialistas en Horticultura.
- Roselló Caselles, J.L. 2003. Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos. Estudios ecofisiológicos. Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología. Valencia.
- Ross, S.M. 1994. Toxic metals in soil-plants systems. Wiley, Chichester, 469.
- Shafi, J., Tian, H. & Ji, M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Agriculture and Environmental Biotechnology, 31: 446-459.
- Shahid, M., Khalid, S., Abbas, G., Shahid, N., Nadeem, M., Sabir, M., Aslam, M. & Dumat, C. 2015. Heavy metal stress and crop productivity. En: Hakeem, K.R. (ed.). Crop production and global environmental issues. Institute of Information Technology, Vehari, Pakistan. 1-25.
- Silvar, C., Merino, F. & Díaz, J. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. Journal of Plant Physiology, 165:1120-1124.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.
- Vázquez García, G. 2013. Mejora de la eficacia de *Penicillium oxalicum* como agente de biocontrol en enfermedades de plantas hortícolas. Escuela técnica

superior de ingenieros agrónomos. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Madrid.

- Villarino, M., De Cal, A., Melgarejo, P., Larena, I. & Espeso, E.A. 2015. The development of genetic and molecular markers to register and commercialize *Penicillium rubens* (formerly *Penicillium oxalicum*) strain 212 as a biocontrol agent. *Microbial Biotechnology*, 9: 89-99.
- Vos, C.M.F., De Cremer, K., Cammue, B.P.A. & De Coninck, B. 2015. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Molecular Plant Pathology*, 16: 400-412.
- Wang, J., Li, T., Liu, G., Smith, J.M. & Zhao, Z. 2016. Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genic aspects. *Scientific Reports*, 6: 22028.
- Yadav, S.K. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76: 167-179.