

Grado en Biología

Departamento de Biología

Área de Fisiología Vegetal

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio de la actividad peroxidasa en el medio extracelular de suspensiones elicidadas con un extracto de hojas de *Moringa oleífera*

Estudo da actividade peroxidasa no medio extracelular de suspensións elicidadas cun extracto de follas de *Moringa oleifera*

Study of the peroxidase activity in the extracellular medium of suspensions elicited with an extract of leaves of *Moringa oleifera*



Lucía Tomé Corredoiras
Julio, 2019

Dirigido por: Dra. Ángeles Bernal Pita da Veiga

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Dña. María de los Ángeles Bernal Pita da Veiga, autoriza la presentación del Trabajo de Fin de Grado “Estudio de la actividad peroxidasa del medio extracelular en suspensiones celulares de pimiento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) elicitadas con un extracto de hoja de *Moringa oleifera*”, presentado por Lucía Tomé Corredoiras para su defensa ante el Tribunal Evaluador.

En A Coruña, a 10 de Julio del 2019

Fdo.: BERNAL PITA DA VEIGA MARIA DE LOS ANGELES - 32758950G
Firmado digitalmente por BERNAL PITA DA VEIGA MARIA DE LOS ANGELES - 32758950G
Fecha: 2019.07.17 12:35:27 +02'00'

Índice

1. Introducción	1
1.1. <i>Moringa oleifera</i> Lam.....	1
1.2. Cultivo <i>in vitro</i>	3
1.2.1. Callos.....	4
1.2.2. Suspensiones celulares.....	4
1.2.3. Elicitación.....	5
1.3. Papel del medio extracelular.....	6
1.4. <i>Capsicum annuum</i> L. y enfermedades asociadas.....	6
1.5. Enzima peroxidasa.....	8
2. Objetivos	10
3. Material y métodos	10
3.1. Material vegetal.....	10
3.2. Medio de cultivo.....	11
3.3. Inicio de una línea celular.....	12
3.3.1. <i>Vitro plant</i>	12
3.3.2. Inducción de callos.....	13
3.3.3. Repicado de callos.....	13
3.3.4. Inicio de suspensión celular.....	13
3.3.5. Repicado de suspensión celular.....	14
3.4. Elaboración de los extractos de <i>Moringa</i>	14
3.5. Elicitación de las suspensiones celulares.....	15
3.5.1. Inicio de suspensiones para elicitar.....	15
3.5.2. Elicitación.....	15
3.5.3. Recogida de las muestras.....	15
3.5.4. Medición de las muestras.....	16
Desalado de las muestras.....	16
Determinación de la actividad peroxidasa.....	16
Análisis estadístico.....	16
4. Resultados y discusión	17
4.1. Obtención de <i>vitro plant</i>	17
4.2. Obtención de callos y repicado.....	17
4.3. Obtención de suspensiones celulares y repicado.....	18
4.4. Determinación de la actividad peroxidasa.....	19
4.4.1. Actividad peroxidasa a las 6 horas.....	20
4.4.2. Actividad peroxidasa a las 24 horas.....	22
5. Conclusiones	23
5. Conclusións	23
5. Conclusions	23
6. Bibliografía	23

Resumen

En este trabajo se realizó un estudio de la actividad peroxidasa del medio extracelular en suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* al ser elicitadas con extracto de hoja de *Moringa oleifera*. Para ello, a partir de plantas *in vitro*, se iniciaron suspensiones celulares de pimiento y se elicitaron con un extracto de hoja *Moringa*. Posteriormente, se determinó la actividad peroxidasa mediante espectrofotometría. Los resultados obtenidos indican que el extracto acuoso de *Moringa* aumenta la actividad peroxidasa del medio extracelular tanto a las 6 horas como a las 24 horas.

Abstract

In this work, a study of the peroxidase activity of the extracellular medium of cellular suspensions of *Capsicum annuum* L. var. *annuum* elicited with leaf extracts of *Moringa oleifera*. For this, from cell plants *in vitro*, pepper cell suspensions were initiated and elicited with an extract of *Moringa* leaf. Subsequently, the peroxidase activity was determined by spectrophotometry. The results obtained indicate that the aqueous extract of *Moringa* increases the peroxidase activity of the extracellular medium both at 6 hours and at 24 hours.

Resumo

Neste traballo realizouse un estudo da actividade peroxidasa do medio extracelular en suspensións celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* ao ser elicitadas cun estrato de folla de *Moringa oleifera*. Para iso, a partir de plantas *in vitro*, iniciáronse suspensións celulares de pemento e se elicitaron cun estrato de folla de *Moringa*. Posteriormente, determinouse a actividade peroxidasa mediante espectrofotometría. Os resultados obtidos indican que o extracto acuoso de *Moringa* aumenta a actividade peroxidasa do medio extracelular tanto as 6 horas como as 24 horas.

Palabras clave

Moringa oleifera, elicitor, peroxidasa, suspensiones celulares, cultivo *in vitro*, *Capsicum annuum*

Key words

Moringa oleifera, elicitor, peroxidase, cell suspensions, *in vitro* culture, *Capsicum annuum*

Palabras chave

Moringa oleifera, elicitor, peroxidasa, suspensións celulares, cultivo *in vitro*, *Capsicum annuum*

1. INTRODUCCIÓN

1.1- *Moringa oleífera* Lam.

Moringa oleífera Lam., comúnmente conocido como rábano picante o árbol de la vida, entre otros nombres, es un árbol perenne pero poco longevo y de crecimiento acelerado perteneciente a la familia Moringaceae, que normalmente suele alcanzar los 10-12 metros de altura.

Es originario del sur del Himalaya, desde el Noreste de Pakistán hasta el Norte de Bengala, en la India, pero ha sido introducido en diferentes lugares como Bangladesh, Afganistán, Pakistán, Sri Lanka, Asia occidental, Península Arábiga, Madagascar, el sur de la Florida, las islas del Caribe, Paraguay y Brasil (Liñan, 2010).



Figura 1: Distribución mundial de *Moringa oleífera* L. Fuente: <https://cantineoqueteveo.io/moringa-tree-images.html>

Una de las características más importante de la *Moringa* es su capacidad de resistencia a la sequía y su potencial agronómico siendo cultivable tanto en las regiones áridas como en las semiáridas.

Crece generalmente en suelos que están bien drenados y bajos en materia orgánica y además de aportar una elevada cantidad de nutrientes al suelo, lo protege frente a factores externos tales como la desecación, la erosión y las elevadas temperaturas.

Otra característica a destacar es que el consumo de *Moringa* ofrece numerosos beneficios nutritivos y contribuye a la prevención de enfermedades.

Todas las partes de la planta son comestibles desde la raíz hasta las hojas y tienen atribuidas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas y antimicrobianas (Parrotta, 1993).

Sus hojas son ricas en proteínas (hasta un 30% de su peso está formado por proteínas) y contienen todos los aminoácidos esenciales en un perfil alto y bien equilibrado. También presentan minerales, β -carotenos, tiaminas, riboflavinas y otras vitaminas, particularmente A y C.



Figura 2: Hojas y semillas de la planta *M. oleifera* L. Fuente: <https://cantineoqueteveo.io/moringa-tree-images.html>

Las flores son ricas en Ca y K y al igual que las raíces, contienen pterigospermina, un antibiótico efectivo en la lucha contra el cólera.

Por otra parte, las semillas de la *Moringa* presentan algunas proteínas funcionales con capacidad coagulante. Esta tecnología se ha fusionado con el tratamiento de aguas, que es de vital importancia, ya que la escasez de agua dulce en el planeta es una problemática real causada principalmente por la escasez de lluvias, la sobreexplotación de mantos acuíferos y la contaminación del medio natural (García Fayos, 2007). Es decir, estas semillas se consideran un método eficaz y de bajo costo para eliminar la turbidez y reducir la contaminación bacteriana del agua potable en las comunidades rurales ya que actúa como coagulante independientemente del pH del agua.

Además, las semillas contienen entre un 31% y 47% de aceite que puede ser empleado para consumo humano o también para la obtención de biodiesel, al tener un alto porcentaje en ácido oleico (Liñan, 2010).

1.2- Cultivo *in vitro*

Conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento y/o crecimiento de células o tejidos en un medio nutritivo, aséptico y en condiciones ambientales controladas.

La reproducción de plantas *in vitro* es posible gracias a la propiedad de totipotencia de las células vegetales, es decir, gracias a la capacidad de regenerar un nuevo organismo completo a partir de una célula o grupos de células, sin necesidad de unión sexual.

Hay una gran diversidad de medios de cultivo y se componen generalmente de una mezcla de sales minerales (macro y micro nutrientes), vitaminas, aminoácidos o suplementos nitrogenados, sacarosa, agua, agentes gelificantes y reguladores del crecimiento. Esta composición depende de la especie vegetal y del tipo de cultivo que se requiere (Castillo, 2004).

Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento. Reproducir en el laboratorio los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es muy complicado y para ello se escogen aquellos que se puedan mantener controlados (luz, temperatura, humedad).



Figura 3: Plantas *in vitro* germinadas en cámara de cultivo

Cuando se realiza el estudio con únicamente una parte del ser vivo, se utiliza el término explante para indicar la parte del tejido vegetal que se cultiva *in vitro*.

A la dificultad de reproducir las condiciones naturales en condiciones de laboratorio, se le suma la dificultad de suministrar al explante todo aquello que antes obtenía del sistema completo.

En definitiva, el cultivo *in vitro* exige un control específico del ambiente en el que se sitúa al explante y conviene conocer cuáles son los principales factores que lo conforman y que deberán ser controlados (Castillo, 2004).

El desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales permite el establecimiento de nuevos métodos de propagación en especies de reproducción vegetativa y, además, contribuye a complementar los trabajos de mejoramiento genético en distintas especies.

1.2.1- Callos

Un callo es un conjunto de células vegetales indiferenciadas que se dividen continua y desorganizadamente al ser cultivadas en un medio sólido.

No tienen patrones predecibles de organización, están presentes en centros localizados de actividad meristemática y a menudo aparecen en regiones cambiales rudimentarias con zonas de diferenciación vascular.

Para iniciar un callo hay que escoger el explanto que se va a utilizar, el método de esterilización del mismo y la composición del medio de cultivo en el que va a crecer.

Una de las características más importantes del callo, desde un punto de vista funcional, es su irregular crecimiento, teniendo el potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que forman plántulas (Billard, 1995).

1.2.2- Suspensión celular

Las suspensiones celulares se inician mediante la introducción de un fragmento de callo friable en un medio de cultivo líquido, que se encuentra en movimiento continuo y se incuba a 25°C en una cámara de cultivo.

Estos callos se inician a partir de fragmentos esterilizados de la planta, que se inducen en placas con medio sólido suplementado con hormonas. Esto tiene

como ventaja, que se produce un crecimiento en masa a una tasa muy rápida con todas las células uniformemente expuestas al medio de cultivo.

Al cabo de varios días de incubación, la suspensión estará próxima a su punto de saturación y para que esto no suceda es necesario realizar subcultivos, es decir, diluir la suspensión celular. Por ello, durante los primeros subcultivos, es recomendable utilizar una tasa de dilución baja usando cuatro partes de medio fresco por cada parte de suspensión celular que tengamos (Roca & Mroginski, 1991).

Las principales ventajas de las suspensiones celulares están relacionadas con el rápido crecimiento celular, transformación genética, alta expresión de proteínas y bajo contenido en fenoles (Gupta & Ibaraki, 2006).



Figura 4: Suspensiones celulares en cámara de cultivo

1.2.3- Elicitación

La elicitación es uno de los métodos más efectivos para inducir la expresión de genes asociados con enzimas responsables de la síntesis de metabolitos secundarios como mecanismo de defensa contra el ataque de patógenos o daños en plantas.

Los elicitores son sustancias naturales o minerales que al ser aplicadas en las plantas de forma preventiva ayudan a reducir o evitar daños producidos por enfermedades, plagas o factores abióticos adversos.

Es decir, son moléculas capaces de inducir cualquier tipo de defensa en la planta y son producidos por agentes estresantes bióticos y abióticos (Namdeo, 2007). Se puede decir que la aplicación de un elicitador actúa en la planta con el mismo principio de la vacunación; se activa el metabolismo de la planta y se hace más resistente a posteriores ataques que generan estrés.

El uso de los elicitores ha aumentado por los beneficios que se desencadenan al utilizarlos en los cultivos, pues actúan generalmente en forma de precursores de metabolitos secundarios. Estos impiden o retardan la entrada del patógeno a las plantas, pero también limitan su actividad en el tejido u órgano que ha sido infectado (Intagri, 2017).

1.3- Papel del medio extracelular

El término medio extracelular hace referencia a “todo lo que está fuera de la membrana plasmática” y se compone de la pared celular y el espacio entre ellas (espacio intercelular) en el que el medio líquido se mueve libremente.

El líquido que se obtiene después de la filtración de las suspensiones se denomina fluido apoplástico y desempeña un papel fundamental en la interacción planta-patógeno.

El apoplasto de las células vegetales está formado por agua, carbohidratos, proteínas, lignina, metabolitos y multitud de compuestos inorgánicos (Agrawal et al., 2010) y en cultivos de suspensiones celulares, tiene la ventaja de que puede ser fácilmente separado de las células sin la rotura de las mismas.

Gracias a ello, proporciona una fuente continua de compuestos, pudiendo considerarse el medio de cultivo donde crecen las células vegetales, como un enorme y amplio espacio intercelular que forma un continuo con la pared vegetal.

1.4- *Capsicum annuum* L. y enfermedades asociadas

La mayor parte de los cultivos existentes de pimiento pertenecen a la especie *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, familia Solanaceae.

El pimiento es una planta anual, herbácea, muy ramificada y con hojas pecioladas. Presenta flores blancas, pequeñas y solitarias, y al igual que otras solanáceas, son hermafroditas al tener androceo y gineceo.

El fruto del pimiento es una baya hueca en forma de cápsula en posición caída, lo cual es una ventaja al protegerlos del Sol. Florece de mayo a agosto y fructifica desde julio hasta noviembre.



Figura 5: Planta y flor de *Capsicum annuum*. Fuente: <https://www.ecoterrazas.com/blog/el-cultivo-del-pimiento/>

Casi todas las especies de pimiento son originarias de la zona tropical e intertropical de América del Sur, en la región comprendida entre Bolivia y Perú. Fue después del descubrimiento de América cuando el pimiento llegó a España. La denominación de *Capsicum* procede, según algunos autores, de "cápsula" y otros creen que de capsicina, alcaloide que le da el característico sabor picante (Reche Mármol, 2010).

La "tristeza" del pimiento es la enfermedad de origen criptogámico más importante y con mayor transcendencia económica en el cultivo de esta solanácea. Los síntomas característicos son fundamentalmente:

- Pérdida de turgencia de los tejidos, lo que se traduce en marchitamientos parciales o totales.
- Menor intensidad del color verde en los órganos aéreos.
- Menor desarrollo global de la planta (Palazón & Palazón, 1989).

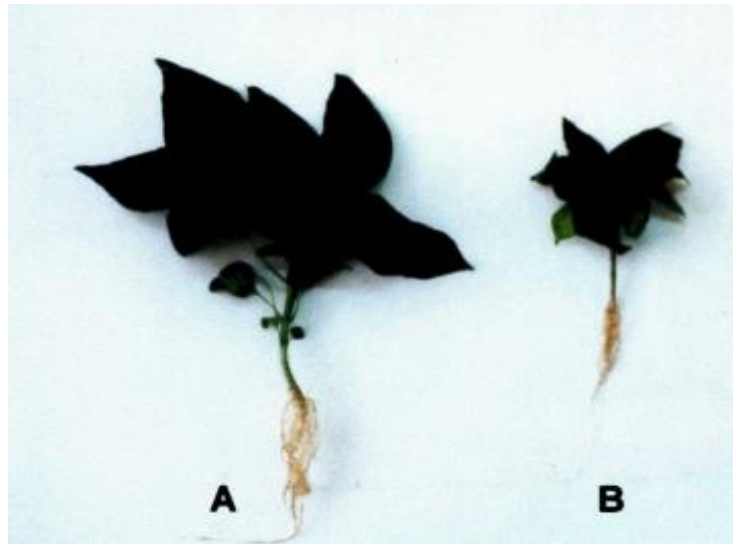


Figura 6: plantas *C. annuum*, control (A) y enferma por "tristeza" (B) tomada de Pomar, F. (2000 Tesis Doctoral)

Estudios etiológicos realizados por Palazón & col. (1978) han permitido determinar que los tres agentes causales son: la asfixia radicular y los hongos patógenos *Phytophthora capsici* Leon. y *Verticillium dahliae* Kleb.

1.5- Enzima peroxidasa

Durante la respuesta de las plantas ante los patógenos, se produce el incremento de gran cantidad de enzimas. Unas estarían implicadas directamente en la defensa frente al hongo, como las glucanasas y quitinasas, y otras actuarían secundariamente en otros procesos. Este sería el caso de aquellas enzimas implicadas en la síntesis de fitoalexinas, o en la generación y control de las especies activas de oxígeno. Entre todas estas enzimas, destacan por su gran plasticidad metabólica las peroxidadas.

La peroxidasa (H_2O_2 : donador de hidrógeno: H_2O_2 oxidorreductasas) es una de las enzimas que controlan el crecimiento fisiológico de las plantas, su diferenciación y desarrollo. Participa en la construcción y lignificación de la pared celular, la biosíntesis de etileno, la regulación de los niveles de auxinas y la protección contra el deterioro de tejidos e infección por microorganismos patógenos.

Son proteínas que tienen un grupo porfirínico y un metal (catión hierro) como grupo prostético y que catalizan la oxidación de una gran variedad de substratos a expensas de H₂O₂ en dos pasos consecutivos de un solo electrón (Zapata et al., 1998).



Como la mayoría de las enzimas, la peroxidasa puede ser inactivada por el calor, siendo una de las que precisa mayor temperatura y tiempo para su inactivación. Además, presenta un alto grado de polimorfismo, el cual puede ser estudiado mediante isoelectroenfoque.

De acuerdo con su punto isoeléctrico, las isoenzimas de peroxidasa se pueden clasificar en: ácidas (pI < 7,0), moderadamente básicas (7,0 < pI < 9,0) o fuertemente básicas (pI > 9,0) (Hoyle, 1977).

Probablemente, para compensar su baja especificidad de substrato, la peroxidasa es una enzima que presenta una compartimentalización tisular muy específica. Está localizada principalmente en las paredes celulares, tanto en las paredes primarias como en los engrosamientos secundarios (Ros Barceló, 1995).

Actualmente, estas enzimas son relativamente fáciles de estudiar gracias al desarrollo, por una parte, de sencillos métodos espectrofotométricos para su detección y, por otra, de técnicas de separación electroforéticas y cromatográficas. Esto, ha determinado la abundancia de investigaciones acerca de su naturaleza, mecanismo de acción, posibles funciones fisiológicas, así como sobre la gran variedad de isoenzimas existentes (Gaspar & col., 1982).

2. OBJETIVOS

La peroxidasa ha sido descrita como la enzima clave en los procesos de lignificación que tienen lugar en el apoplasto de las plantas vasculares. El medio extracelular en el que crecen cultivos celulares vegetales, puede ser considerado como un amplio espacio intercelular que forma una continuidad con la pared de la célula vegetal. Por esta razón, las suspensiones celulares constituyen una herramienta de trabajo útil para el estudio de las peroxidasas localizadas en la pared celular y pueden ser empleadas para identificar los posibles eventos bioquímicos inducidos en respuesta a un ataque fúngico.

En este trabajo de investigación, se estudia la capacidad elicitora de extractos de hojas de *Moringa oleifera* sobre el medio extracelular de suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. observando el efecto que provoca la aplicación de este elicitor en la cantidad de enzima peroxidasa presente.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1- Material vegetal

Las hojas de *Moringa* utilizadas para este trabajo se han obtenido a partir de una plantación del invernadero de la Facultad de Ciencias.



Figura 5: Plantación de *Moringa oleifera* del invernadero de la Facultad de Ciencias

3.2- Medio de cultivo

Vitro plant

Productos	Concentración
Sales Murashige y Skoog	4,406 g/L
Vitamina de Morel	1 ml/L
Caseína	0.25 g/L
Sacarosa	30 g/L
Agar	8 g/L

Tabla 1: Composición del medio de cultivo de *vitro plant*

Cultivo de callos

Productos	Concentración
Sales Murashige y Skoog	4,406 g/L
Vitamina 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
Agar	8 g/L

Tabla 2: Composición del medio de cultivo de callos

Suspensiones celulares

Productos	Concentración
Sales Murashige y Skoog	4,406 g/L
Vitamina 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

Tabla 3: Composición del medio de cultivo de suspensiones celulares

Para preparar los diferentes medios de cultivo se emplea un matraz de 1L en el que se añaden 500 ml de agua destilada y los componentes mencionados anteriormente.

Posteriormente se lleva el matraz a un agitador magnético para homogeneizar la disolución y se ajusta el pH a 5,85 mediante la adición de NaOH o HCL.

Finalmente, se autoclava a 121° C durante 20 minutos.

3.3- Inicio de una línea celular

3.3.1- *Vitro* plant

Para ello utilizamos semillas de pimiento de Padrón, *Capsicum annum* L. var. *annuum*, que se colocan en una gasa bien cerrada con un clip.

A continuación, se esterilizan las semillas en un vaso de precipitados:

- 1º con etanol al 70% durante 2 minutos
- 2º con hipoclorito sódico al 20% durante 20 minutos

Todo ello bajo agitación en un agitador magnético con la ayuda de una mariposa.

Posteriormente pasamos a trabajar en la cabina de flujo laminar, esterilizada anteriormente, donde se realizan 3 lavados de las semillas con agua estéril para quitar el exceso de los productos anteriores.

Abrimos el paquete con las semillas haciendo un corte en la gasa con la ayuda de un bisturí esterilizado y se ponen a secar en un papel de filtro también estéril durante 1 hora y media. Cuanto más tiempo dejemos secar las semillas, menor peligro de contaminación tendremos.

Una vez secas, las colocamos con la ayuda de unas pinzas en varios tarros de cristal lo suficientemente separadas para que tengan buen espacio para crecer y los sellamos con parafilm. Finalmente se anota la fecha y se introducen en la cámara de cultivo.

3.3.2- Inducción de callos

Los callos empleados se obtienen a partir de las *vitro* plant y todo este proceso se realiza en la cabina de flujo laminar, previamente esterilizada.

Para ello, se seleccionan las plantas de pimiento sanas que han crecido en el interior de los tarros de cristal y con la ayuda de una pinza y bisturí esterilizados, las colocamos en una placa Petri y cortamos sus hojas. Preferiblemente utilizamos las hojas nuevas y las seccionamos longitudinalmente, depositándolas con una pinza en otra placa Petri, pero esta vez con medio nutritivo enriquecido con 2,4D y kinetina.

Es importante colocar los trozos con el envés hacia el medio porque es donde se encuentran los estomas. También hacemos lo mismo con el tallo.

Por último, se sellan las placas con parafilm y se incuban en la oscuridad a temperatura ambiente.

3.3.3- Repicado de callos

Pasadas 3 semanas aproximadamente, dependiendo del crecimiento y color, se procede al repicado de los callos en el interior de la cabina de flujo laminar, previamente esterilizada.

Con la ayuda de pinzas y bisturí esterilizados se extrae del callo la parte vegetal y se lleva éste a otra placa Petri con medio de cultivo, donde se fragmenta y se deposita presionando con las pinzas para que quede en contacto con el medio de cultivo. Este procedimiento se realiza también con el resto de callos incubados.

Finalmente, se sellan las placas con parafilm y se vuelven a incuban en la oscuridad a temperatura ambiente.

3.3.4- Inicio suspensión celular

Para ello, se seleccionan los callos que se puedan desmenuzar con facilidad y se separan con la ayuda de un bisturí y pinzas esterilizadas.

A continuación, se pesan 8g de callo en un erlenmeyer de 100ml y se añaden 40ml de medio líquido (sin agar). Tapamos los recipientes con papel de aluminio y anotamos la fecha. Todo el proceso ocurre en la cámara de flujo laminar.

Por último, se incuban los erlenmeyer en oscuridad, sometiéndolos a agitación continua en la cámara de cultivo.

3.3.5- Repicado de suspensión celular

El repicado se realiza mediante una dilución 1:2 con medio de cultivo fresco cada semana, dependiendo del estado de la suspensión.

Para ello se añaden otros 40ml de medio de cultivo a los erlenmeyers que contienen las suspensiones, se agitan y se divide el contenido por igual en dos erlenmeyer. Todo el proceso se realiza en la cámara de flujo laminar.

Finalmente se incuban en oscuridad, sometiéndolos a agitación continua en la cámara de cultivo. Las suspensiones que pardearon o adquirieron colores no deseados fueron eliminadas.

3.4- Elaboración de los extractos de *Moringa*

La elaboración de los extractos de *Moringa* se realiza a partir de hojas secas de esta planta, cultivadas en el invernadero de la Facultad de Ciencias, que fueron sometidas a un proceso de deshidratación en la estufa a 70° durante 48 horas.

Posteriormente, con la ayuda de un mortero, se trituraron hasta obtener un polvo fino a partir del cual se llevó a cabo la extracción.

Para el extracto, se pesaron 50 mg de polvo fino de *Moringa* y se le añadieron 2,5ml de agua destilada. Esta muestra se calentó en un termobloque a 100°C durante 15 min y se dejó enfriar durante otros 5 min en agua. Finalmente se filtró dos veces: primero mediante un papel de filtro del laboratorio y después se hizo pasar el extracto por un filtro de 0,22µm para esterilizarlo.

3.5- Elicitación de las suspensiones celulares

3.5.1- Inicio de suspensiones para elicitar

Transcurridos los días de incubación, las suspensiones celulares más saturadas se filtraron con un colador colocado sobre un tarro de cristal, dentro de la cabina de flujo laminar. Para asegurarnos de que lo pesado se corresponda con el material vegetal, se presiona cuidadosamente con una cuchara el filtrado para eliminar el máximo medio posible.

A continuación, se pesan 4g del material que se ha recuperado y lo depositamos en un erlenmeyer junto con 40ml de medio de cultivo líquido.

Este proceso se repitió hasta obtener 4 matraces para cada experimento: Control 6h, Control 24h, *Moringa* 6h, *Moringa* 24h.

Finalmente, los matraces se guardaron en oscuridad en la cámara de cultivo con agitación continua hasta su elicitación.

3.5.2- Elicitación

La elicitación tuvo lugar pasadas 24h del inicio de las suspensiones celulares en la cabina de flujo laminar.

Para ello se añadió 100 μ l de agua destilada en cada uno de los controles (Control 6h y 24h) y 100 μ l del extracto de *Moringa* con agua en cada uno de los matraces tratados (*Moringa* 6h y 24h).

Finalmente, las suspensiones se incubaron en oscuridad en la cámara de cultivo con agitación continua.

3.5.3- Recogida de las muestras

La recogida de muestras tuvo lugar a las 6h y a las 24h después de la elicitación. Para ello, las suspensiones se filtraron al vacío a través de una placa de porcelana y se recogió el fluido extracelular, valorándose su volumen final.

3.5.4- Medición de las muestras

- Desalado de las muestras

Para proceder al desalado de las muestras, primero se centrifugaron 15ml de cada muestra durante 30 min a 4°C y 12000rpm.

Una vez transcurrido el tiempo, descartamos el pellet y nos quedamos con el sobrenadante, que es donde se quedan las enzimas que nos interesan.

Para desalarlas utilizamos 2,5ml de cada muestra centrifugada, que son purificadas por cromatografía sobre Sephadex G-25, equilibrada en tampón Tris-HCL 50 mM pH 7,5 utilizando una columna PD-10 de Pharmacia.

Al final de este proceso, se obtienen 3,5ml de muestra purificada. Es decir, 4 muestras x 4 experimentos = 16 muestras purificadas listas para medir.

- Determinación de la actividad peroxidasa

Para determinar la actividad peroxidasa, asumimos ausencia de la enzima en el tiempo 0 y observamos su evolución en el primer minuto en el espectrofotómetro.

Para ello medimos la absorbancia a 595nm utilizando: tampón Tris-HCL 50 mM pH 7,5, H₂O₂ 0,5 mM y 4-metoxi- α -naftol 1mM como donador de electrones ($\epsilon_{595} = 21,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Por cada muestra se realizaron 3 réplicas y se hizo una media de ambas.

- Análisis estadístico

Los datos se expresaron con su respectivo error típico de la media, que se halló mediante un análisis de la desviación estándar.

Las representaciones gráficas se llevaron a cabo con el programa Microsoft Office Excell 2013.

4. RESULTADOS

4.1- Obtención de *vitro* plant

La obtención de plantas *in vitro* duró entre 15 y 20 días.

Las semillas de *Capsicum annuum*, esterilizadas con etanol al 70% y posteriormente con hipoclorito sódico al 20%, crecieron sin ningún tipo de contaminación. El medio de cultivo elegido hizo posible el crecimiento de la mayoría de las semillas.

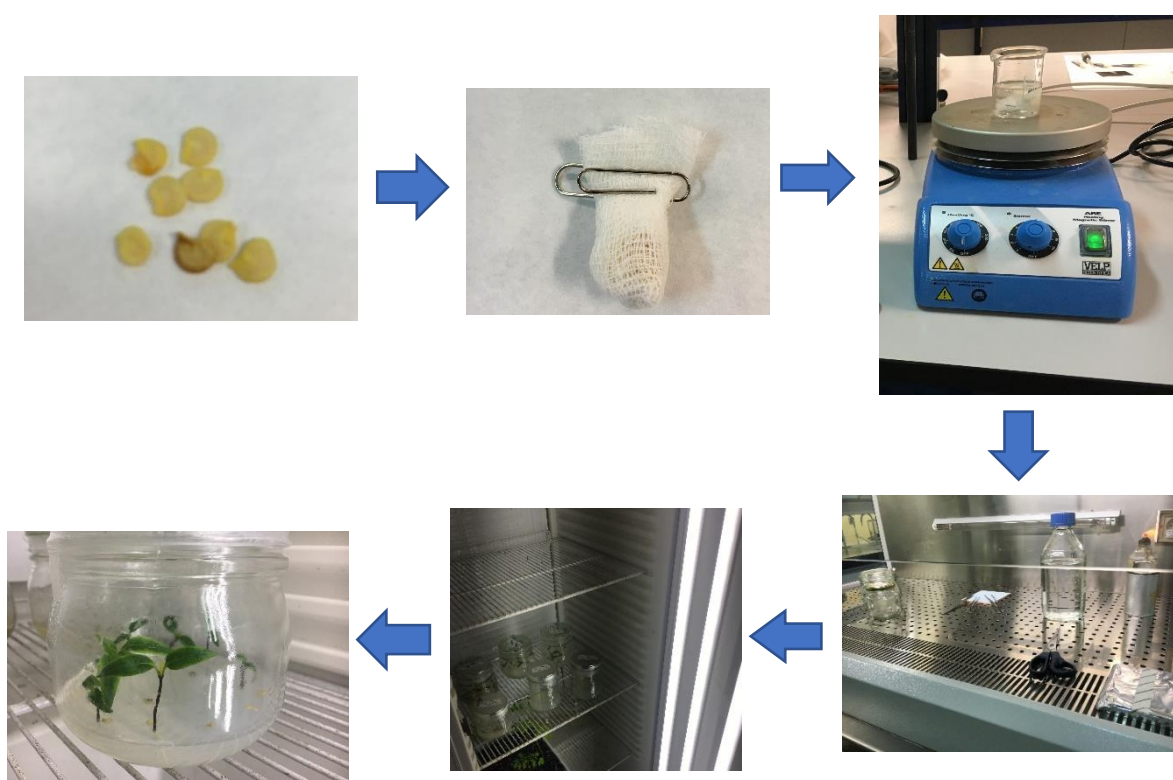


Figura 6: Esquema de obtención *vitro* plant

4.2- Obtención de callos y repicado

A partir de las hojas y tallos de las plantas *in vitro* anteriores se indujo la formación de callos. Para ello, se utilizó un medio de cultivo con hormonas, imprescindible para que se produjese la dediferenciación del tejido vegetal.

Las primeras masas de callos se observaron a los 15 del inicio y se utilizaron para repicar en un nuevo medio de cultivo sólido. Pasado un mes, se observó el desarrollo del callo completo.

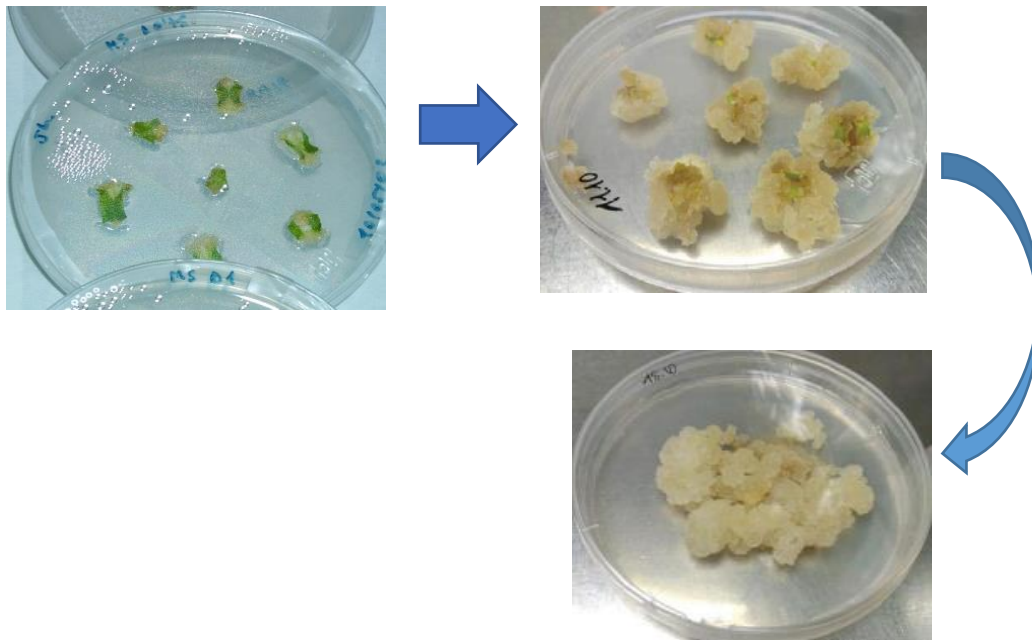


Figura 5: Esquema de obtención y repicado de callos

4.3- Obtención de suspensiones celulares y repicado

Por último, las suspensiones celulares se iniciaron a partir de los callos completamente desarrollados y de un medio de cultivo líquido igual que el anterior, pero sin agar.

Aquellas en las que se observó un calor parduzco oscuro fueron descartadas. Después de varias diluciones, se consiguieron las suspensiones celulares deseadas y se conservaron en la cámara de cultivo.

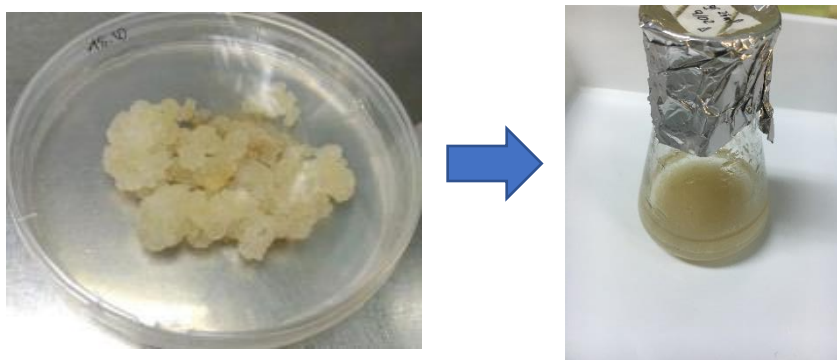


Figura 6: Esquema de obtención de suspensiones celulares

4.4- Determinación de la actividad peroxidasa

4.4.1- Actividad peroxidasa a las 6 horas

Al realizar la medida de las absorbancias en el espectrofotómetro a tiempo 1 min, de las muestras recogidas 6 horas después de la elicitación, se observaron datos de absorbancia más elevados en las muestras elicitadas con extracto acuoso de *Moringa* y, por lo tanto, una tendencia al aumento de la actividad peroxidasa frente a sus respectivos controles (Tabla 4).

6 HORAS			
Muestras elicitadas con agua		Muestras elicitadas con extracto acuoso de <i>Moringa oleifera</i>	
Absorbancia	nkat/ml muestra	Absorbancia	nkat/ml muestra
0.426	6.57	0.527	8.13
0.421	6.50	0.558	8.61
0.398	6.14	0.567	8.75
0.403	6.22	0.505	7.79

Tabla 4: Absorbancias y sus respectivas actividades peroxidasa en muestras elicitadas con agua y con extracto acuoso de *Moringa* a las 6 horas

La cuantificación de la actividad peroxidasa se llevó a cabo en el medio extracelular con el objetivo de estudiar el papel del apoplasto como una de las primeras barreras entre la planta y un posible patógeno.

Las peroxidases extracelulares intervienen en las interacciones con elicitores o patógenos, en la construcción y lignificación de la pared celular. La lignificación inducida provoca que las paredes celulares sean mucho más resistentes a una penetración mecánica e incluso a la degradación enzimática, ya que la lignina puede proteger físicamente a los polisacáridos de la pared de las enzimas

degradativas del hongo. Así mismo, los precursores fenólicos de la lignina podrían presentar actividades antifúngicas.

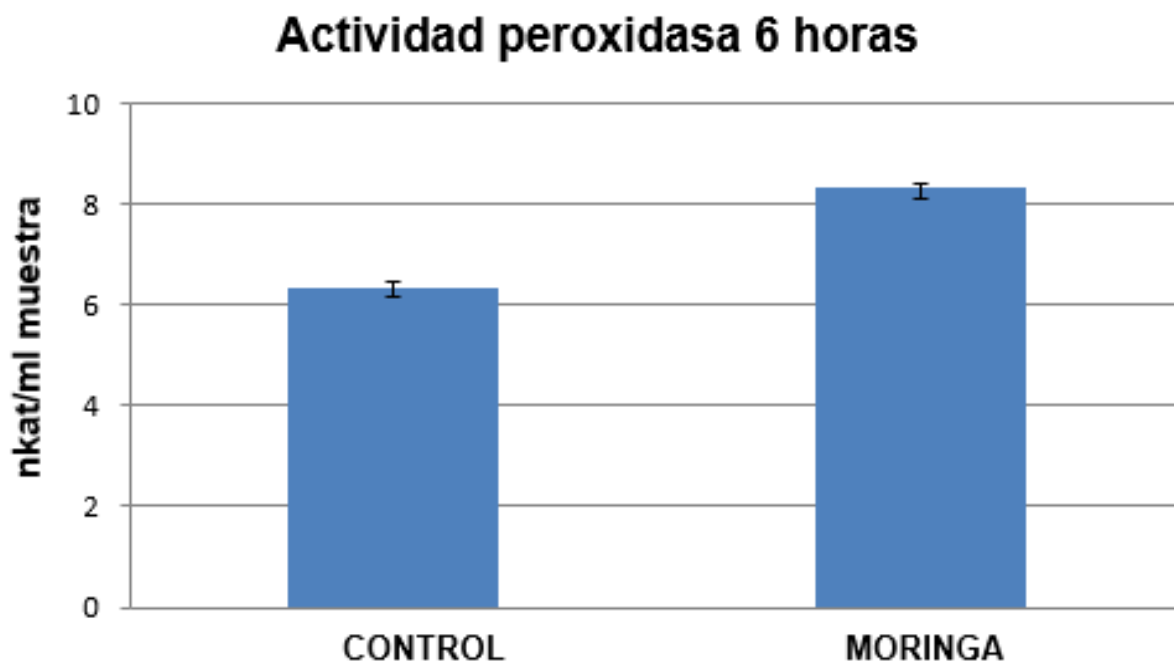


Figura 7: Actividad peroxidasa de las suspensiones celulares a las 6 horas

Los resultados obtenidos a las 6 horas se representan en la Figura. 7., mostrando la actividad peroxidasa (nkat) frente a los tratamientos (Control 6h, *Moringa* 6h).

Como se puede observar, la aplicación de la *Moringa oleífera* como elicitador provoca un aumento significativo en la cantidad de enzima peroxidasa presente en el medio extracelular.

4.4.2- Actividad peroxidasa a las 24 horas

Al realizar la medida de las absorbancias en el espectrofotómetro a tiempo 1 min, de las muestras recogidas 24 horas después de la elicitación, también se observaron datos de absorbancia más elevados en las muestras elicidadas con extracto acuoso de *Moringa* y, por lo tanto, una tendencia al aumento de la actividad peroxidasa frente a sus respectivos controles (Tabla 5).

24 HORAS			
Muestras elicitadas con agua		Muestras elicitadas con extracto acuoso de <i>Moringa oleifera</i>	
Absorbancia	nkat/ml muestra	Absorbancia	nkat/ml muestra
0.714	11.02	0.899	13.87
0.722	11.14	0.884	13.64
0.698	10.77	0.857	13.23
0.703	10.85	0.822	12.68

Tabla 5: Absorbancias y sus respectivas actividades peroxidasa en muestras elicitadas con agua y con extracto acuoso de *Moringa* a las 24 horas

Al comprar ambas tablas (4 y 5) podemos observar que, tanto las muestras elicitadas con agua como las muestras elicitadas con extracto acuoso de *Moringa*, presentan una mayor actividad peroxidasa a las 24 horas de la elicitación.

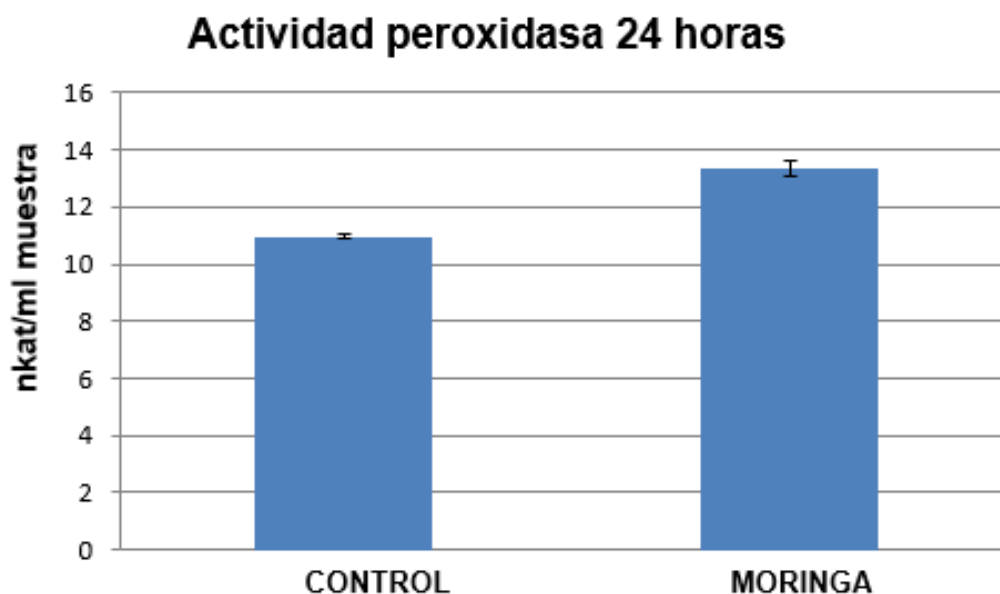


Figura 8: Actividad peroxidasa de las suspensiones celulares a las 24 horas

La aplicación de la *Moringa oleifera* como elicitor provoca un aumento significativo en la cantidad de enzima peroxidasa presente en el medio extracelular (Figura 8).

En este trabajo, el uso de suspensiones celulares se debe a que proporcionan una fuente de células homogéneas que no está limitada por el crecimiento lento, por enfermedades o por variaciones en el medio ambiente, como ocurre con las plantas *in vivo*. Además, las suspensiones constituyen una herramienta de trabajo útil para el estudio de las peroxidasas localizadas en la pared celular, puesto que el espacio intercelular, en este caso, el medio extracelular, se obtiene directamente mediante técnicas no destructivas (Ferri et al., 2018)

Se ha observado que la elicitación de suspensiones con extracto de *Moringa*, además de incrementar la actividad peroxidasa, induce la formación y liberación de compuestos fenólicos (Fernandez Vazquez, 2018; Verde Yáñez, 2017), que están relacionados con la formación de pared celular y la actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos se acumulan rápidamente durante la interacción huésped-patógeno y median en la supresión de la enfermedad por medio de la inactivación de enzimas, o mediante la formación de componentes estructurales de la planta.

Moringa oleifera puede constituir un medio alternativo a la defensa frente a patógenos ya que aumenta la concentración de la actividad peroxidasa, imprescindible para la respuesta frente a una infección. Es decir, el extracto de *Moringa* es un buen candidato para ser utilizado en la inducción de resistencia, pero tiene que ser probado y analizado en plantas completas.

El desarrollo de inductores de resistencia inducida contra enfermedades, se establece como una alternativa al control de plagas que existe tradicionalmente y además permite la disminución del uso de pesticidas, que constituyen una preocupación con respecto a la preservación y conservación del medio ambiente.

En conclusión, este trabajo es un inicio en la investigación de la capacidad elicitora, en este caso de *Moringa*, sobre el medio extracelular y debe ser complementando con el estudio de otros sistemas de defensa.

5. Conclusiones

- Puesta a punto de un método de obtención de suspensiones celulares de *C. annuum* var. *annuum* a partir de *vitro* plant con el fin de realizar un ensayo de elicitación con extracto de hojas de *Moringa oleifera*.
- La elicitación con extracto acuoso de *Moringa* incrementa levemente la actividad peroxidasa en el medio extracelular de las suspensiones celulares de *C.annuum* var. *annuum* tanto a las 6 horas como a las 24 horas.

5. Conclusión

- Posta a punto dun método de obtención de suspensións celulares de *C. annuum* var. *annuum* a partir de *vitro* plant co fin de realizar un ensaio de elicitación cun estrato de follas de *Moringa oleifera*.
- A elicitación con estrato acuoso de *Moringa* incrementa levemente la actividad peroxidasa no medio extracelular das suspensións celulares de *C. annuum* var. *annuum* tanto as 6 horas como as 24 horas.

5. Conclusions

- Development of a method for obtaining cell suspensions of *C. annuum* var. *annuum* from *vitro* plant in order to perform an elicitation test with *Moringa oleífera* leaf extract.
- Elicitation with aqueous *Moringa* extract slightly increases the peroxidase activity in the extracellular medium of cell suspensions of *C.annuum* var. *annuum* both at 6 hours and at 24 hours.

6. Bibliografía

Billard, C. 1995. Inducción de callos utilizando la técnica de cultivo "in vitro". 3 p. En: Guía de Trabajos Prácticos de Fisiología Vegetal. Fac. Cs. Agropecuarias. UNER.

Bonal Ruiz R, Rivera Odio RM & Bolívar Carrión ME. *Moringa oleífera*: una opción saludable para el bienestar. Medisan [revista en línea]. 2012

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay*.

Fernández Vázquez, A. Estudio da capacidade antioxidante do medio extracelular de suspensións elicidadas cun estrato de follas de *Moringa oleifera* [trabaja de fin de grado]. A Coruña: Universidade da Coruña; 2018.

Ferri, M., Gruarin, N., Barbieri, F., Tassoni, A. (2018). *Capsicum spp in vitro* liquid cell suspensions: A useful system for the production of capsaicinoids and polyphenols. *Plant Biosyst.*, 152(3): 436- 444.

Flocco, C.G., Álvarez, M^a.A. & Giulietti, A.M^a. (1998). Peroxidase production *in vitro* by *Armoracia lapathifolia* (horseradish)-transformed root cultures: effect of elicitation on level and profile of isoenzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28, 33-38.

García Fayos, B. (2007). Metodología de extracción *in situ* de coagulantes naturais para la clarificación de agua superficial. Aplicación en países en vías de desarrollo. Valencia.

Gaspar, TH., Penel, C., Thorpe, T. & Greppin, H. (1982). Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Universite de Geneve. Switzerland.

Gupta, SD & Ibaraki, Y. (2006). *Plant tissue Culture Engineering*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Hoyle MC. 1977. High resolution of peroxidase-indolacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. *Plant Physiol* 60:787-793.

Intagri. 2017. La Inducción de Defensa en las Plantas a través de Elicitores. Serie Fitosanidad Núm. 92. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 6 p.

Liñan, F. (2010). *Moringa oleifera* EL ÁRBOL DE LA NUTRICIÓN. Ciencia y Salud.

López do Campo, J. 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*. [trabaja de fin de grado]. A Coruña: Universidade da Coruña; 2019.

Muñoz Garmendia, F. & Navarro, C. (1998). Flora ibérica. Plantas vasculares de la península Ibérica e Islas Baleares. Vol.XI. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC, pp.163-166.

Namdeo, AG (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews* 1:69-79

Olson, M. E., & Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista mexicana de Biodiversidad*, 82, 1071- 1082

Palazón, C., Gil, R. & Palazón, I. (1978). La "tristeza" o "seca" del pimiento. Estado actual del problema. ITEA 32, 56-62

Palazón, C. & Palazón, I. (1989). Estudios epidemiológicos sobre la "tristeza" del pimiento del Valle Medio del Ebro. Bol. San. Veg. Plagas 15, 233-262

Parrotta, J. A. (1993). *Moringa oleifera* Lam. 366-370.

Reche Mármol, J. (2010). *Cultivo del pimiento dulce en invernadero*. Sevilla: Consejería de Agricultura y Pesca, Servicio de Publicaciones y Divulgación.

Roca, W. & Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. 1ª ed. Cali: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), pp.174-195.

Ros Barceló, A. (1995). Peroxidase and not laccase is the enzyme responsible for cell wall lignification in the secondary thickening of xylem vessels in *Lupinus*. *Protoplasma* 186, 41-44.

Verde Yáñez, L. (2017). Ensayo de elicitación de suspensiones celulares utilizando como elicitor un extracto de hojas de *Moringa oleifera*. Grao en Biología Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología Área de Fisiología Vegetal. A Coruña. Universidade da Coruña. Facultade de Ciencias.

Zapata JM, Sabater B & Martín M. 1998. Identification of a thylakoid peroxidase of barley which oxidizes hydroquinone. *Phytochemistry* 48: 1119-1123.

