

Universidade de Vigo



FACULTADES DE BIOLoxÍA DE GALICIA

UNIVERSIDADE DA CORUÑA



---

## Máster interuniversitario en Biología Marina

Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña

**Estudio de la aplicación de extractos de un alga marina (*Sargassum muticum*) y otros agentes para inducir resistencia a hongos patógenos de pimiento.**

**Study for the application of seaweed extracts (*Sargassum muticum*) and other agents to induce resistance against pathogenic fungi of pepper.**

**Estudo da aplicación de extractos dunha alga mariña (*Sargassum muticum*) e outros axentes para inducir resistencia a fungos patóxenos de pemento.**

**Autor: Ismael González Cuns**

Directores: José Díaz Varela y Javier Veloso Freire

Fecha: Septiembre, 2019

Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña

Estudio de la aplicación de extractos de un alga marina (*Sargassum muticum*) y otros agentes para inducir resistencia a hongos patógenos de pimiento.


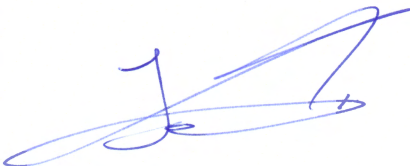
Study for the application of seaweed extracts (*Sargassum muticum*) and other agents to induce resistance against pathogenic fungi of pepper.

Estudo da aplicación de extractos dunha alga mariña (*Sargassum muticum*) e outros axentes para inducir resistencia a fungos patóxenos de pemento.

Que el presente trabajo de Máster presentado por el graduado en Biología ISMAEL GONZÁLEZ CUNS ha sido realizado en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología de la Universidade da Coruña bajo la dirección de los abajo firmantes y cumple con las condiciones exigidas para obtener el Máster en Biología Marina, por lo que autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman la presente en A Coruña, a 04 de Septiembre de 2019.

Directores:

	
José Díaz Varela	Javier Veloso Freire

## Financiación

---

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

# Índice:

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 El pimiento.....	3
1.1.2 <i>Capsicum annuum</i> L. cv Padrón .....	4
1.2 Enfermedades del pimiento.....	4
1.2.1 <i>Verticillium dahliae</i> .....	5
1.2.2 <i>Phytophthora capsici</i> .....	5
1.2.3 <i>Botrytis cinerea</i> .....	5
1.3 Defensa de la planta .....	6
1.4 Inductores de resistencia o elicitores .....	6
1.4.1 Macroalgas como elicitores.....	7
1.4.2 <i>Sargassum muticum</i> (Yendo) Fensholt .....	8
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
3.1 Material vegetal .....	11
3.2 Material fúngico.....	11
3.3 Preparación de extractos .....	11
3.4 Aplicación de los tratamientos y toma de muestras.....	12
3.5 Inoculación con <i>Verticillium dahliae</i> y medida de los síntomas .....	12
3.6 Inoculación de <i>Phytophthora capsici</i> y medida de los síntomas .....	13
3.7 Inoculación con <i>Botrytis cinerea</i> y medida de los síntomas.....	14
3.8 Determinación de compuestos fenólicos solubles totales.....	15
3.9 Determinación de Lignina.....	16
3.10 Expresión génica.....	16
3.11 Análisis estadístico .....	18
4. RESULTADOS .....	19
4.1 <i>Sargassum muticum</i> protege frente a <i>V.dahliae</i> .....	19
4.2 <i>Sargassum muticum</i> protege frente a <i>P.capsici</i> .....	20
4.3 <i>Sargassum muticum</i> favorece la enfermedad causada por <i>B.cinerea</i> .....	21
4.4 <i>Sargassum muticum</i> y la fracción de alpechín número 12 inducen genes de resistencia en <i>C.annuum</i> .....	21
4.5 <i>Sargassum muticum</i> y las dos fracciones de alpechín no alteran el contenido en fenoles solubles totales.....	22
4.6 <i>Sargassum muticum</i> y las dos fracciones de alpechín no alteran el contenido en lignina .....	23
5. DISCUSIÓN.....	25
6. CONCLUSIONES.....	29
7. BIBLIOGRAFÍA.....	30

## RESUMEN

Las algas han sido usadas desde siempre por el hombre como fertilizante, alimento para el ganado y en ocasiones para la alimentación humana. En agricultura el uso de las algas como fertilizantes permite un aporte ecológico de nutrientes que incluye magnesio, potasio, zinc, hierro y nitrógeno. Además de este uso clásico de las algas en la agricultura, se ha observado que las algas contienen también sustancias que estimulan las defensas de las plantas frente a enfermedades causadas por hongos, bacterias o virus. Estas sustancias incluyen gran variedad de compuestos como polisacáridos, péptidos, hormonas vegetales, derivados fenólicos, etc. El uso de estas algas como agentes inductores de resistencia (elicitors) permite reducir el uso de pesticidas químicos. Además, en este trabajo se usó el alga *Sargassum muticum* catalogada como invasora en Galicia (catálogo español de especies exóticas invasoras, código SARMUT/EEI/AL007), favoreciendo la explotación su control. En este trabajo se ensayó un extracto crudo de *S.muticum* para inducir resistencia en pimiento (*C. annuum*) a tres patógenos de plantas: *V.dahliae*, *P.capsici*, *B.cinerea*. Para poder comparar la efectividad del alga, se usaron adicionalmente dos fracciones semi-purificadas de extractos del residuo derivados de la producción de aceite de oliva (alpechín). El extracto del *S.muticum* fue el tratamiento que más redujo los síntomas causados por *V.dahliae* y *P.capsici*. Sin embargo el extracto de *S.muticum* aumento los síntomas causados por *B.cinerea*. La fracción número 12 (F12) del alpechín redujo los síntomas solo en el caso de *V.dahliae*. El extracto de *S.muticum* y F12 indujeron varias respuestas defensivas de la planta, como la expresión de varios genes de resistencia de la planta y la deposición de lignina.

## SUMMARY

Algae have always been used by humans as fertilizer, food for livestock and sometimes for human consumption. In agriculture, the use of algae as fertilizers allows an ecological supply of nutrients that includes magnesium, potassium, zinc, iron and nitrogen. In addition to this classic use of algae in agriculture, it has been observed that seaweed also contain substances that stimulate plant defenses against diseases caused by fungi, bacteria or viruses. These substances include a wide variety of compounds such as polysaccharides, peptides, plant hormones, phenolic derivatives, etc. The use of these algae as resistance inducing agents (elicitors) allows to reduce the use of chemical pesticides. In addition, in this work the algae *Sargassum muticum* cataloged as an invader species in Galicia (Spanish catalog of invasive

species, code SARMUT/EEI/AL007) was used. The commercial exploitation of this seaweed would favor its control. In this work a crude extract of *S.muticum* was assayed to induce resistance in pepper (*C. annuum*) to three diseases; *V.dahliae*, *P.capsici*, *B.cinerea*. In order to compare the effectiveness of the algae, two semi-purified fractions of extracts of the residue derived from the production of olive oil (olive mill wastewater, called alpechín in spanish) were used as well. *S.muticum* extract was the treatment that reduced the most the symptoms caused by *V.dahliae* and *P.capsici*. However, *S.muticum* extract increased the symptoms caused by *B.cinerea*. Fraction number 12 (F12) of alpechín reduced symptoms only in the case of *V.dahliae*. The extract of *S.muticum* and F12 induced several plant defense responses, as the expression of several plant resistance genes and the deposition of lignin.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El pimiento

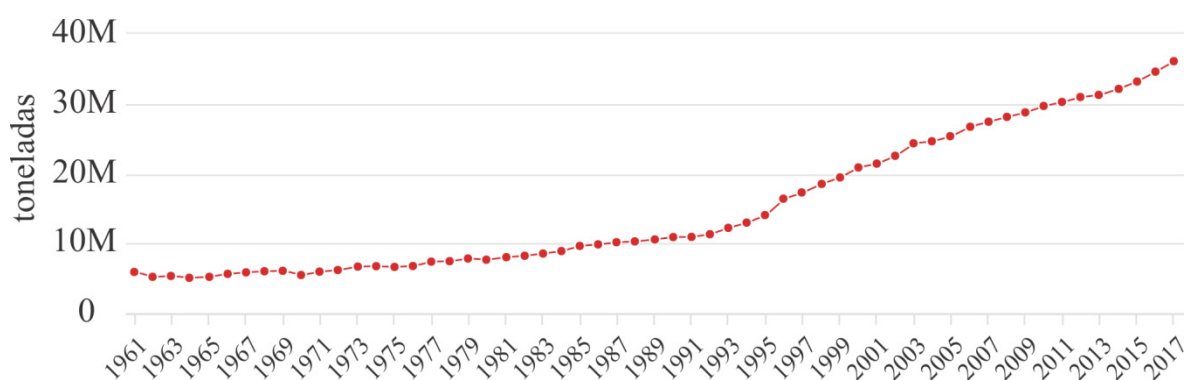
El pimiento es una solanácea perteneciente al género *Capsicum* (Tabla 1). Las especies que comprende este género son 20, pero solo cuatro se emplean en los cultivos: *C.annuum* L. (tabla 1), *C.frutescens* L., *C.pendulum* Willd. y *C.pubescens* R. & P., siendo *C.annuum* la más cultivada (Baudoin *et al.* 2002).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la especie *Capsicum annum* L.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Subfamilia	Solanoideae
Género	Capsicum

A nivel mundial se produjo en 2017 un total de 36 millones de toneladas de pimiento (figura 1), con una clara tendencia al alza en las últimas décadas (FAOSTAT, 2017). Asia es el continente que mantiene una mayor producción de esta hortaliza, representando el 62% de la producción mundial, frente a Europa, con un 20%, América, con un 15% y África con un 3% (FAOSTAT, 2017). La producción de pimiento en España en 2017 fue de más de un millón de toneladas, siendo el mayor productor a nivel europeo (FAOSTAT, 2017).

El principal uso del pimiento es a nivel culinario. En España, el pimiento se consume de diferentes formas, tanto fresco como seco, y es parte fundamental de muchos platos típicos del país.



**Figura 1.** Gráfica que representa la tendencia de la producción de pimiento a nivel mundial desde el año 1961 al 2017 (FAOSTAT, 2017).

### 1.1.2 *Capsicum annuum* L. cv Padrón

El cultivar de *Capsicum annuum* conocido como ‘pimiento de Padrón’ es uno de los principales pimientos producidos en Galicia. En 2009 se logró el reconocimiento como Denominación de Origen Protegida “pemento de Herbón” la producción del cultivar Padrón en un área concreta de Galicia. Su nombre es el topónimo de la parroquia del ayuntamiento de Padrón en la que se ubica el monasterio al que se vincula la introducción de este pimiento procedente de América. El fruto posee las siguientes características: sección longitudinal cónica o troncocónica, siendo ligeramente rugoso y marcando en el ápice 3 o 4 lóculos. El diámetro de la base oscila entre 1,5 y 2 cm, siendo la longitud del fruto entre 3,4 y 5,5 cm. El peso del fruto oscila entre 3,5 y 4,5 g por unidad. La zona de producción está constituida por los municipios de: Padrón, Dodro y Rois pertenecientes a A Coruña y Pontecesures y Valga pertenecientes a la provincia de Pontevedra (MAPAMA, 2019).

### 1.2 Enfermedades del pimiento

Las plantas son atacadas por una multitud de organismos entre los que se incluyen insectos y patógenos como los virus, los hongos y las bacterias (Pieterse & Dicke, 2007). Las infecciones de estos fitopatógenos pueden causar graves daños en las plantas, incluyendo la muerte de estas, lo que conlleva grandes pérdidas económicas si sucede en cultivos de interés comercial como el pimiento.



En el caso de *C. annuum*, tres de los principales organismos patógenos que causan infecciones en las plantas son *Phytophthora capsici* Leon., *Verticillium dahliae* Kleb. y *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (Diaz *et al.*, 2005).

### **1.2.1 *Verticillium dahliae***

*Verticillium dahliae* es un ascomiceto parasito causante de la Verticilosis, uno de los principales problemas fitopatológicos de los cultivos de pimiento. La germinación de los propágulos de este hongo es estimulada por los exudados de la raíz de la planta. El micelio penetra a través de heridas en los tejidos o por los puntos de formación de raíces secundarias. Desde ahí, crece entre las células del meristemo apical hasta llegar a los elementos inmaduros del xilema, donde se multiplica. Los conidios se transportan a través del xilema a la parte aérea de la planta, produciéndose así la invasión del sistema vascular de la planta. La restricción en el movimiento del agua, junto con el efecto de la interacción de toxinas, enzimas y hormonas, conducen a la alteración de la fisiología normal de la planta y la aceleración de la senescencia (Cooper, 2000). Este hongo causa la marchitez generalizada de la planta y reduce su crecimiento.

*V. dahliae* permanece en los suelos mediante esporas o conidios, hifas melanizadas y microesclerocios (Pegg, 1974), teniendo estos últimos una gran capacidad de supervivencia de hasta 10-14 años en ausencia de hospedador, lo que dificulta su control.

### **1.2.2 *Phytophthora capsici***

El oomiceto filamentoso *Phytophthora capsici*, es un patógeno muy dinámico y destructivo que afecta a muchas especies vegetales. La infección de este pseudohongo (en Fitopatología se suele considerar como un hongo porque su patología es similar a los hongos verdaderos) causa la pudrición de la raíz, cuello, hojas y frutos de los vegetales afectados (Erwin & Ribeiro, 1996), aunque estos síntomas van a variar dependiendo de la planta infectada y las condiciones ambientales (Lamour *et al.* 2011). En condiciones óptimas (25-30°C y alta humedad relativa), el tiempo desde la infección a la esporulación es de 2-3 días. *P. capsici* puede reproducirse de manera sexual o asexual, dándose este último tipo de reproducción solo cuando las condiciones son favorables.

### **1.2.3 *Botrytis cinerea***

El hongo *Botrytis cinerea* pertenece a un género muy diverso, cuyas especies difieren en su ecología, morfología y rango de hospedadores (Elad *et al.*, 2015). Es un hongo filamentoso,

con un estilo de vida necrotrofo, matando a las células de la planta huésped a la que infecta mediante la secreción de toxinas y enzimas líticas (Van Kan *et al.*, 2014). *B. cinerea* causa graves pérdidas en más de 200 cultivos alrededor del mundo, ya que es el causante de la enfermedad conocida como “podredumbre gris” (Williamson *et al.*, 2007). Este hongo es difícil de controlar, ya que tiene una amplia variedad de métodos de infección, diversos hospedadores y puede sobrevivir en el medio durante largos periodos de tiempo (Elad *et al.*, 2015).

### **1.3 Defensa de la planta**

Para hacer frente a los ataques de organismos fitopatógenos, las plantas cuentan con una amplia gama de mecanismos de defensa constitutivos o inducibles. Ante el ataque de un insecto o de un patógeno en la planta se producen una serie de eventos moleculares que activan rutas de señalización como la del salicilato, jasmonato y etileno. Estas rutas forman parte de la respuesta inmune de la planta (Koornneef & Pieterse, 2008). La interacción entre las diferentes rutas de señalización va a ser lo que determine la táctica de defensa de la planta. Las plantas disponen de dos respuestas sistémicas de resistencia, primera, la respuesta sistémica adquirida (SAR) y segunda, la respuesta sistémica inducida (ISR). La SAR depende de la señalización celular de la hormona vegetal, ácido salicílico. Por otra parte, la ISR depende de la señalización de las hormonas vegetales, ácido jasmónico y etileno. Estas dos respuestas de resistencia son antagónicas lo que significa que la activación de una de las respuestas de resistencia implica la desactivación de la otra. Esto es importante porque cada una es efectiva frente a un rango de patógenos diferentes. La SAR es efectiva frente a biotrofos, patógenos que se alimentan de las células vivas, como los virus. La ISR es efectiva frente a necrotrofos, patógenos que se alimentan de células muertas. Estas respuestas pueden ser activadas por sustancias bióticas o abióticas, denominadas inductores de resistencia o elicitores.

### **1.4 Inductores de resistencia o elicitores**

Hay una amplia gama de agentes inductores de resistencia a patógenos en las plantas. Estos agentes reciben el nombre de elicitores. Un elicitador es cualquier compuesto que induce la acumulación en la planta de sustancias antimicrobianas como las fitoalexinas o cualquier tipo de respuesta de defensa en la misma (Sbaihat *et al.* 2015). Los elicitores pueden ser tanto abióticos como bióticos (Lyon, 2007), ya que se pueden obtener o aislar de bacterias, hongos, algas, plantas o pueden sintetizarse químicamente. Diversos tipos de moléculas

pueden actuar como elicitores: proteínas, ácidos grasos, lípidos, oligosacáridos, polisacáridos y péptidos (Keen & Bruegger, 1977). Este trabajo centra su atención en el uso de las macroalgas como agentes inductores de resistencia a patógenos en plantas. Adicionalmente también se usarán extractos vegetales de alpechín (desechos de la producción de aceite de oliva) como posibles inductores de resistencia.

#### **1.4.1 Macroalgas como elicitores**

Las macroalgas han demostrado su utilidad como bioestimulantes y fertilizantes en la agricultura, siendo utilizadas en zonas costeras ya desde hace décadas para abonar la tierra. Esto se debe a que influyen en procesos como la respiración, la fotosíntesis, la síntesis de ácidos nucleicos y la captación de iones (Shekhar Sharma *et al.* 2013). La mejora de los procesos fisiológicos de las plantas permite aumentar la eficiencia de los cultivos.

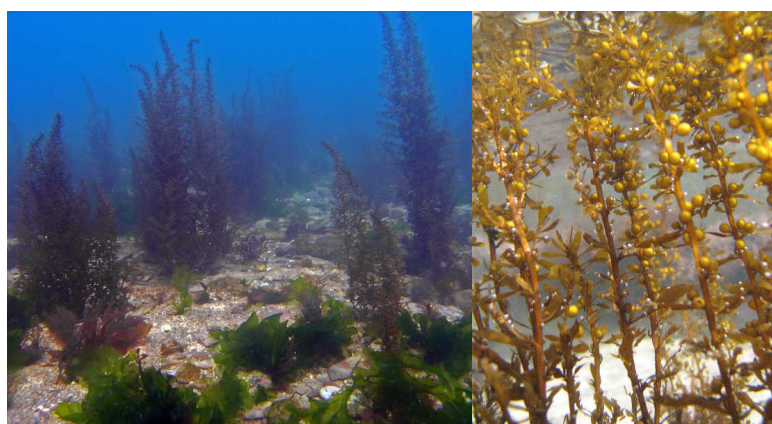
Los extractos de macroalgas también han demostrado su utilidad como agentes que reducen el desarrollo de enfermedades causadas por organismos patógenos en las plantas. Esta reducción la pueden provocar de dos formas: de manera directa, actuando como agentes con actividad antibiótica, o de manera indirecta, como fitofortificantes, induciendo la resistencia de la planta (Pardo *et al.* 2014).

Especies de las tres divisiones de algas (Rhodophyta, Ochrophyta y Chlorophyta) producen metabolitos, hormonas vegetales (auxinas, giberelinas, citoquininas) o poseen componentes estructurales capaces de producir una respuesta inhibitoria para las infecciones de bacterias, virus, hongos y otros patógenos que afectan a las plantas terrestres (Shekhar Sharma *et al.* 2013). La mayoría de los polisacáridos que poseen las macroalgas (ulvanos, fucanos, carragenanos, laminarina, alginatos) y sus oligosacáridos derivados, tienen la capacidad de activar la respuesta defensiva de la planta y protegerla contra un determinado rango de patógenos. Estos componentes estructurales o de reserva desencadenan un estallido oxidativo inicial a nivel local, activando las rutas de señalización de las hormonas ácido salicílico, ácido jasmónico y/o etileno a nivel sistémico (Vera *et al.* 2011). Estas rutas de señalización modifican la expresión génica de la planta, aumentando la producción de un conjunto de proteínas conocidas de forma genérica como proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas PR. Además, también se produce un aumento de la producción de enzimas y otros metabolitos (terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos) con actividad antimicrobiana (fitoalexinas) o que producen un aumento de las barreras físicas como el engrosamiento de la pared celular (p. ej., la producción de lignina). La producción de

proteínas PR y la acumulación de estas enzimas y metabolitos, va a determinar la protección de la planta frente a organismos patógenos.

#### 1.4.2 *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt

*Sargassum muticum* (S.mut) es un alga parda del orden fucales (tabla 2) originaria de Japón. Encontrada por primera vez en Europa a principios de los años 70 en las costas de Bembridge, Reino Unido. En España, esta especie invasora se detectó por primera vez en 1985, concretamente en Guipuzcoa (Casares *et al.* 1987). Actualmente la especie se encuentra distribuida ampliamente por el Pacífico norte, Atlántico norte y por el mar Mediterráneo. Su aparición y colonización de otros ambientes fuera de su zona de origen se asocian al transporte de ostras desde Japón (Casares *et al.* 1987).



**Figura 2.** Ejemplares de *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, en fondos arenosos (izquierda). Vista cercana de los ejemplares donde se aprecia la forma y disposición de las ramas, así como la presencia de los pneumatocistos (derecha). Fotos extraídas de <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1477>.

*Sargassum muticum* tiene una coloración pardo-verdosa y puede alcanzar los 4 metros de longitud. Se fija al sustrato por medio de un disco basal del que parte un eje delgado que se ramifica alternamente en la parte superior, dándole una disposición en espiral a las ramas alrededor del eje. En estas ramas crecen otras filiformes, con margen entero o algo aserrado y sin nervio. Presenta pneumatocistos con pedúnculos cortos, encontrándose más abundantemente en la parte basal. Posee receptáculos dioicos, cilíndricos y pedunculados, no ramificados, de algo más de 1 cm de longitud.

Tiene una tasa de crecimiento muy rápida y una alta fecundidad. Presenta un ciclo monogenético con autofecundación, que permite que un solo individuo pueda generar un

gran número de plántulas. Los receptáculos se producen en primavera y verano. La dispersión también se puede producir mediante fragmentos de la fronde desprendidos que son arrastrados por las corrientes. El periodo de crecimiento se produce entre febrero y mayo, el reproductivo en verano y va seguido de un periodo de senescencia en el que las plantas se cubren de epífitos (Ministerio para la Transición Ecológica, 2019. Catálogo español de especies exóticas invasoras., código SARMUT/EEI/AL007).

Suele distribuirse sobre las rocas o sobre las conchas de moluscos y pequeñas piedras de fondos arenosos, hasta unos 10 m de profundidad, a partir del mesolitoral inferior en zonas moderadamente expuestas o protegidas (Pérez-Cirera *et al.* 1989).

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. Extraída de [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org).

Reino	Chromista
División	Ochrophyta
Clase	Phaeophyceae
Orden	Fucales
Familia	Sargassaceae
Género	Sargassum

Su alta tasa de crecimiento y fecundidad, su alta tolerancia a los cambios en el medio y su gran capacidad de regeneración, permiten que la especie colonice fácilmente nuevos ambientes y desarrolle el estatus de especie invasora. En este trabajo se propone la explotación de esta especie para su uso en agricultura como elicitador de resistencia.

## 2. OBJETIVOS

Este trabajo tiene los siguientes objetivos:

- Comprobar la capacidad de protección de un extracto del alga parda *Sargassum muticum* y de dos fracciones semi-purificadas de alpechín (residuo de la producción del aceite de oliva) frente a los patógenos *Botrytis cinerea*, *Verticillum dahliae* y *Phytophthora capsici* en la planta de cultivo *Capsicum annuum*.
- Comprobar la capacidad de un extracto del alga parda *Sargassum muticum* y de dos fracciones semi-purificadas de alpechín como agentes inductores de mecanismos de defensa de la planta.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado para todos los experimentos consistió en plantas de *C. annuum* cv. Padrón. Se partió de semillas almacenadas en nevera en condiciones de sequedad, procedentes del cultivo en invernadero realizado por el grupo FISAPLANT anualmente. Se sembraron varias bandejas con semillas en un sustrato de vermiculita y se regaron con solución nutritiva de Hoagland y Arnon (1950). Todas las plantas, salvo las de los experimentos de inmersión de la raíz, fueron trasplantadas a las dos semanas de edad a macetas de plástico individuales con un sustrato compuesto por una parte de perlita y tres de tierra (v/v). Las plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25 y 18°C respectivamente, durante todo el proceso de crecimiento.

Se empleó también para los tratamientos la especie de alga parda *Sargassum muticum*, la cual fue proporcionada ya deshidratada por el Dr. Manuel Estebán Sastre de Vicente (Universidade da Coruña). También se usaron para los tratamientos dos fracciones semi-purificadas de alpechín (extracto vegetal residual de la producción de aceite de oliva) proporcionadas por el Dr. Marin Prodanov (Universidad Autónoma de Madrid). En el grupo de Marin Prodanov se separaron varias fracciones de alpechín por peso molecular. Las dos fracciones aquí ensayadas son las más purificadas y se han denominado como F10 y F12.

#### 3.2 Material fúngico

Se emplearon cultivos de *Botrytis cinerea* (aislado B0510, proporcionada por el Dr. Jan van Kan de la Wageningen University and Research Center, Países Bajos), *Verticillium dahliae* (aislado UDCVd53, de la colección de hongos del grupo FISAPLANT) y *Phytophthora capsici* (aislado PC450, proporcionado por el Dr. Frank Panabieres del INRA, Francia) realizando repicados de los mismos para mantenerlos y obtener el inóculo. *B. cinerea* y *V. dahliae* fueron cultivados en medio PDA (Potato Dextrose Agar), y *P. capsici* en medio V8-agar.

#### 3.3 Preparación de extractos

Para la preparación del extracto de Sargassum se pulverizó en mortero el alga deshidratada y se tomaron 100 mg a los que se añadieron 10 ml de agua destilada. Se incubó la mezcla a 70°C durante 15 minutos en un bloque térmico, poniéndose posteriormente a enfriar en agua

durante 5 minutos. Por último, para obtener el extracto, se realizó un filtrado de la mezcla a través de papel de laboratorio para eliminar los restos no disueltos del alga. Las fracciones de alpechín empleadas estaban previamente liofilizadas. Para su preparación se emplearon 50 mg de cada una de las fracciones y se disolvieron en 1 ml de etanol 50% para obtener una solución stock.

### **3.4 Aplicación de los tratamientos y toma de muestras**

Se prepararon 250 ml de cada uno de los tratamientos (control, fracción F10 y F12 de alpechín y extracto de Sargassum) para su posterior pulverización sobre las hojas de las plantas de pimiento. Para la preparación del control se emplearon 125 µl de etanol 50% en 250 ml de agua mineral comercial Fontiña. Para las fracciones F10 y F12 de alpechín, se usaron 125 µl de cada una de las soluciones stock en 250 ml de agua mineral. Por último, el tratamiento de Sargassum se obtuvo mezclando 125 µl de etanol al 50% y 2,5 ml del extracto de Sargassum enrasando a 250 ml con agua mineral. Una vez preparadas las soluciones, se aplicaron a las plantas por pulverización con atomizador hasta que las plantas estaban cubiertas de líquido (unos 5-10 ml por planta). Una vez tratadas las plantas se incubaron en la cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25 y 18°C respectivamente.

La toma de muestras o la inoculación con el patógeno se realizó a las 24 horas después de aplicar los tratamientos. Se tomaron muestras de la raíz de las plantas y se congelaron y almacenaron a -80°C hasta su utilización.

### **3.5 Inoculación con *Verticillium dahliae* y medida de los síntomas**

El aislamiento de los conidios de *V.dahliae* se realizó a partir de colonias del hongo creciendo en placas de medio PDA según el método de Díaz *et al.* (2005). Trabajando en condiciones estériles, en cada placa se añadieron 10 ml de agua destilada estéril y se frotó con una varilla de vidrio la superficie del agar. Esto permite que los conidios se liberen y se suspendan en el agua. Empleando una pipeta se recogió la suspensión y se introdujo en un tubo estéril con tapa. Posteriormente se realizan una serie de centrifugaciones para eliminar sustancias (sustancias de desecho derivadas del crecimiento fúngico) de la suspensión de conidios. La primera centrifugación se realizó a 1500 g durante 5 minutos, retirando después el sobrenadante y añadiendo 3 ml de agua destilada estéril para resuspender los conidios (ambos pasos deben realizarse en la cámara de flujo laminar). La segunda centrifugación se realizó a 1500 g durante 5 minutos, retirando el sobrenadante al terminar y añadiendo



después 3 ml de agua destilada para resuspender los conidios. Una vez obtenida la suspensión de conidios, determinamos la concentración de los mismos por mililitro empleando una cámara de recuento Neubauer Improved y se ajustó la concentración de conidios a  $10^6$  conidios por mililitro.

Ya que *V. dahliae* es un hongo que penetra en la planta a través de la raíz, la inoculación se realizó sumergiendo la raíz de las plántulas de pimiento en la suspensión de conidios durante 45 minutos 24 horas después de aplicar los tratamientos inductores. Luego las plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25 y 18°C respectivamente.

El efecto de la infección por *V. dahliae* se manifestó a través de deficiencias en el crecimiento de las plantas. Para cuantificarlos, se tomó el peso fresco de las plantas a las 4 semanas tras la infección. Se hicieron dos experimentos independientes con 8 plantas por experimento y tratamiento.

### **3.6 Inoculación de *Phytophthora capsici* y medida de los síntomas**

Se sembró *P.capsici* en V8Agar y se cultivó durante 4 días a 23°C. Se inocularon fragmentos del cultivo de *P.capsici* en matraces con nitrato potásico 0,01M estéril, y se incubaron en agitación orbital (150 rpm) otros 4 días a 23°C en una cámara con luz blanca. Tras los 4 días los matraces se incubaron a 4°C durante 45 min para favorecer la liberación de zoosporas de *P.capsici*. Luego se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min, y después se filtró contenido de los matraces a través de una gasa y se hizo un recuento de las zoosporas en una cámara Malassez. Una vez realizado el recuento, se ajustó el inóculo a  $10^4$  zoosporas por mililitro con agua destilada.

Para la inoculación se trasplantaron las plantas de pimiento a bandejas con un sustrato compuesto por tres partes de tierra y una de perlita (v/v) y se encharcaron las plantas con agua del grifo. Posteriormente se añadieron 5 ml del inóculo obtenido previamente al cuello del tallo de cada planta. Se incubaron en cámara con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25 y 18°C respectivamente, y se anotaron los síntomas a las 24, 48 y 72 horas. Los síntomas de las plantas inoculadas con *P.capsici* fueron medidas cualitativamente con una escala de índice de severidad de los síntomas. La escala contiene cinco niveles del cero al cuatro según el nivel de intensidad de los síntomas (tabla 3).

**Tabla 3.** Niveles del índice de severidad usados para cuantificar los síntomas causados por *Phytophthora capsici*.

Índice de severidad	Características
0	La planta no presenta ningún síntoma.
1	El tallo presenta indicios de pudrición de la corona de la raíz (mancha necrótica marrón en la base del tallo), pero no muestra marchitez y está totalmente erguida.
2	El tallo presenta pudrición de la corona de la raíz y marchitez leve (hojas caídas pero expandidas) pero está totalmente erguida.
3	La planta se ha tumbado, pero aún conserva tejidos turgentes (las hojas todavía siguen expandidas) y aún no está clorótica.
4	La planta se ha tumbado, está totalmente marchita (las hojas se arrugan) y tiene clorosis.

La escala de índice de severidad se usó para asignar un valor a cada planta de cada tratamiento. Dichos valores de severidad fueron usados para calcular la AUDPC (área bajo la curva de progresión de la enfermedad) como se describe en Díaz *et al.* (2005). Se hicieron dos experimentos independientes con 6 plantas por experimento y tratamiento.

### 3.7 Inoculación con *Botrytis cinerea* y medida de los síntomas

Para la inoculación se empleó la cepa B0510 del hongo *Botrytis cinerea*. El inóculo se obtuvo a partir de cultivos en placa con medio PDA. Con la ayuda de un sacabocados de 5 mm de diámetro, previamente esterilizado con alcohol y fuego, se realizaron cortes circulares donde se obtuvieron pequeños discos de micelio. Se colocó uno de estos discos de micelio en cada una de las dos primeras hojas verdaderas de cada planta de pimiento. Una vez colocados todos los discos con la parte del micelio en contacto con la hoja se procedió a incubar los grupos de plantas en cajas con tapa, y con un poco de agua en el fondo para aumentar la humedad, ya que la infección con *Botrytis* requiere elevada humedad relativa. Las cajas se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente.

Una vez transcurridas 72 horas desde la inoculación, se pasó a medir los efectos causados en las hojas por la infección de *B.cinerea* en las plantas de los distintos tratamientos. Para ello, se empleó un calibre digital con una precisión de  $\pm 0,01$  mm. Se anotaron los diámetros de las heridas circulares que crecían a partir de los discos de micelio. A partir de los datos

del diámetro de las lesiones se calculó el área foliar afectada por el hongo en cada hoja. Se hicieron dos experimentos independientes con 8 plantas (16 heridas) por experimento y tratamiento.

### **3.8 Determinación de compuestos fenólicos solubles totales**

Los fenoles solubles totales se midieron en muestras de raíces recogidas a las 24 horas tras los tratamientos. Se siguió la metodología de García *et al.* (2018). Para la extracción de compuestos fenólicos solubles las raíces se pulverizan en mortero con nitrógeno líquido. Las muestras pulverizadas se suspendieron en metanol 80% y se incubaron a 70°C durante quince minutos. Después de la incubación, los tubos se enfriaron en hielo y se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante en tubos graduados de 10 ml y se añadieron 5 ml más de metanol 80% en cada tubo. Posteriormente se volvió a centrifugar a 1500 g durante 10 minutos. Tras esta segunda centrifugación, se volvió a recoger el sobrenadante y se mezcló con el sobrenadante anterior. Se enrasó cada tubo a 10 ml empleando metanol 80%. Este sobrenadante enrasado a 10 ml es la muestra sobre la que se medirán los fenoles solubles totales.

Para determinar la concentración de compuestos fenólicos solubles totales, se empleó el método de García *et al.* (2018). Se mezclaron 50µl de la muestra de extracción de fenoles, 750 µl de agua destilada y 50 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu en cada tubo. Se agitaron los tubos y se incubaron tres minutos a temperatura ambiente. Tras ello, se añadieron 150µl de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 20%, se agitaron los tubos y se dejó incubando a temperatura ambiente durante dos horas. Transcurrido ese tiempo se procedió a realizar la medida de la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro. Para poder determinar la cantidad de fenoles fue necesario utilizar una recta de calibrado que se había preparado anteriormente utilizando diferentes concentraciones de un fenol tipo, el ácido gálico. Las soluciones se realizaron con 0,01, 0,02, 0,05 y 0,1 mg de ácido gálico por ml de metanol 80%. Inicialmente la cantidad de fenoles se calculó en mg de fenol por g de peso fresco del material vegetal. A continuación, en cada experimento se relativizaron los datos de cada tratamiento con respecto al control. Se realizaron 4 experimentos independientes.

### **3.9 Determinación de lignina**

La lignina se midió en muestras de raíces recogidas a las 24 horas tras los tratamientos. Previamente a la determinación de la concentración de lignina, se procedió a la extracción de las paredes celulares. Para ello, se parte del precipitado obtenido tras el procedimiento de extracción de fenoles, previamente conservado en metanol puro (García *et al.*, 2018). El metanol se eliminó por centrifugación a 1500 g durante 15 min y se homogeneizó en 10 ml de agua destilada. Posteriormente se realiza otra centrifugación a 1500 g durante 15 min. Se retira el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 6 ml de agua destilada. Esta suspensión se mantuvo en agitación durante una hora. Tras el tiempo de agitación, se repitió la centrifugación y resuspensión previas tres veces, resuspendiendo la última en una solución de tampón fosfato 0,5 M pH 7,0, etanol 5% y proteasa 0,02% preincubada durante dos horas a 37°C. La mezcla anterior se incubó durante 18 horas a 37°C. Tras la incubación se realizaron ocho pasos sucesivos de centrifugación a 1500 g, resuspendiendo las primeras tres veces con agua destilada, otras tres con etanol 95% y las últimas dos con etanol absoluto. Finalmente se retira el etanol y se deja secar el precipitado a temperatura ambiente para que una vez seco, se puedan pesar las paredes extraídas.

Para la medida de la abundancia de lignina en las paredes celulares extraídas, se empleó el método de García *et al.* (2018). Se mezclaron 5 mg de paredes celulares con 1 ml de una mezcla de bromuro de acetilo y ácido acético (1:3 v/v) en tubos cerrados, incubándolos a 50°C durante 2 horas. Posteriormente se añaden a esta mezcla 0,9 ml de NaOH 2N, 5 ml de ácido acético glacial y 0,1 ml de cloruro de hidroxilamonio 7,5 M. Se filtra la solución con lana de vidrio y se enrasa con ácido acético a 10 ml. Por último, se mide 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). En cada experimento se relativizaron los datos de cada tratamiento con respecto al control. Se realizaron 4 experimentos independientes.

### **3.10 Expresión génica**

La expresión génica se midió en muestras de raíces recogidas a las 24 horas tras los tratamientos. Para medir la expresión génica fue necesario obtener el RNA de la planta, sintetizar el cDNA utilizando el RNA extraído como molde y realizar una RT-qPCR con el cDNA.

Primero se pulverizaron las muestras en mortero con nitrógeno líquido. 100mg del polvo de las muestras se utilizaron como material de partida para la extracción del RNA. Para la extracción se siguió el protocolo del “E.Z.N.A.® Plant RNA Kit” de Omega Biotek. Se midió la concentración y la calidad del RNA resultante en espectrofotómetro a una absorbancia de 260 y 280nm. Para sintetizar el cDNA se siguió el protocolo del “iScript cDNA Synthesis Kit” de Bio-Rad partiendo de 1µg de RNA total. Por último, se almacenó el cDNA obtenido a -80°C hasta el análisis de expresión génica.

El análisis de la expresión génica se realizó mediante RT-qPCR. Estos análisis fueron llevados a cabo en la Unidad de Biología Molecular de los SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de A Coruña. Las muestras de cDNA se analizaron con el CFX96 Touch Real Time PCR system de la compañía Bio-Rad. Se cuantificó la expresión de genes de pimiento involucrados en la defensa. Los genes estudiados (target) fueron una peroxidasa (*CaPOI*), una sesquiterpeno ciclasa (*CaSCI*) y una proteína PR1 básica (*CaBPRI*). El gen de la actina (*CaACT*) fue usado como control (housekeeping) (Veloso y Díaz, 2012). Los cebadores usados para la amplificación se indican en la tabla 4.

El análisis de datos se llevó a cabo con el programa CFX Maestro™ v1.1 de Bio-Rad. Los valores de eficiencia y Ct (Cycle threshold) se calcularon con el método de Pfaffl (2001) para obtener valores de expresión relativa. Este método define la expresión génica relativa como:

$$\text{Expresión génica relativa} = \frac{E^{\Delta Ct_{\text{target}} (\text{control}-\text{muestra})}}{E^{\Delta Ct_{\text{housekeeping}} (\text{control}-\text{muestra})}}$$

donde E es la eficiencia y Ct es el número mínimo de ciclos requerido para detectar la señal del amplicón.

Las condiciones usadas para la qPCR fueron 2 min desnaturalización a 95°C seguido de 40 ciclos de amplificación (cada ciclo consiste de 20 s a 95°C, 25 s a 58°C y 50 s a 72°C), seguido de un paso de elongación de 5 min a 72°C (Veloso y Díaz, 2012)..

**Tabla 4.** Primers usados para evaluar la expresión génica por real time qPCR

Gen	Accession number	Referencia	Cebador		
			Nombre	Secuencia	Amplicón
<i>CaSC1</i>	AF061285	Silvar <i>et al.</i> , 2009	<i>CaSCFW</i>	5'GCCTCCTGCTTCTGAATACC3'	312 bp
			<i>CaSCRV</i>	5'TTAATATCCTTCCATCCCGACTC3'	
<i>CaBPR1</i>	AF053343	Gayoso <i>et al.</i> , 2007	<i>PR1FW</i>	5'GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT3'	301 bp
			<i>PR1RV</i>	5'CAAGCAATTATTTAAACGATCCA3'	
<i>CaPO1</i>	AF442386	García <i>et al.</i> , 2015	<i>CAPO1FW</i>	5' ACACTGGAAGCGTGAACAAT 3'	333 bp
			<i>CAPO1RV</i>	5' CAGCTTGCGCTAACATGAAC 3'	
<i>CaACT</i>	AY572427	Silvar <i>et al.</i> , 2009	<i>CaACTFW</i>	5'ATCCCTCCACCTTCTCACTCTC3'	128 bp
			<i>CaACTRV</i>	5'GCCTTAACCATTCTGTTCCATTATC3'	

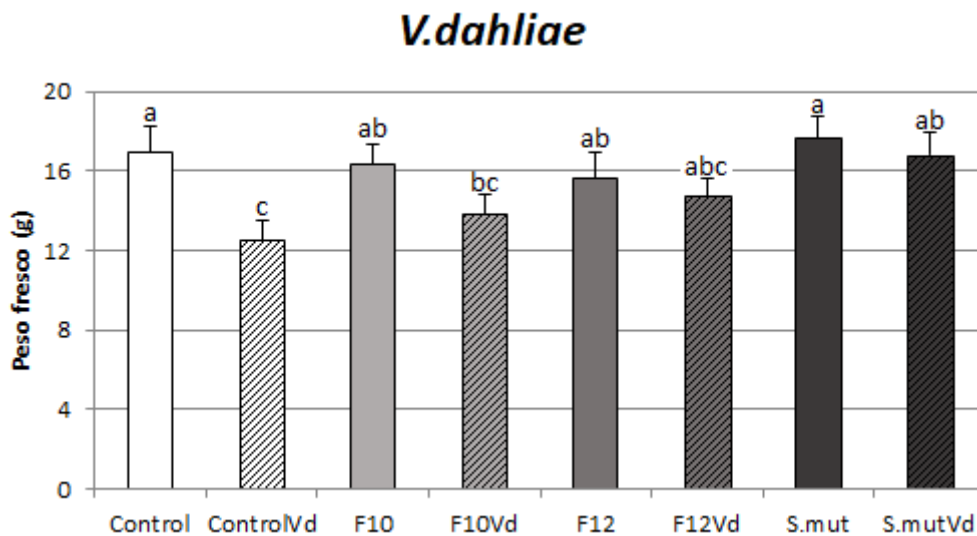
### 3.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los datos se llevó a cabo mediante los programas Excel 2016 y R Studio para Windows. Se empleó un ANOVA seguido de un post-hoc Least Significant Difference (LSD) para el análisis estadístico de los datos de los bioensayos con *Botrytis* y *Verticillium*. Para el análisis de los resultados de expresión génica, así como también para el bioensayo con *Phytophthora* y los ensayos de medida de fenoles y lignina, se usó el test non-paramétrico de Kruskal-Wallis y un post-hoc de Conover.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 *Sargassum muticum* protege frente a *V.dahliae*

Se tomó el peso fresco de las plantas inoculadas con *V.dahliae* a las 4 semanas tras la inoculación. El control inoculado (ControlVd) mostró una reducción en su peso fresco frente al control no inoculado (Control) (figura 3). Las plantas tratadas con *S.muticum* e inoculadas con *V. dahliae* (S.mutVd) mostraron una reducción significativa de los síntomas incrementando su peso fresco hasta alcanzar un valor similar al de las plantas control (figura 3). Adicionalmente las plantas inoculadas y tratadas con las dos fracciones de alpechín también mostraron un peso fresco similar al de las plantas control, pero no significativamente diferente al control inoculado (ControlVd). F10 y F12 parecen reducir los síntomas causados por *V.dahliae* aunque es necesario repetir el ensayo para aumentar la confianza. Cabe notar que ambas fracciones de alpechín parecen reducir levemente el peso fresco de las plantas no inoculadas frente al control no inoculado, aunque de manera no significativa.

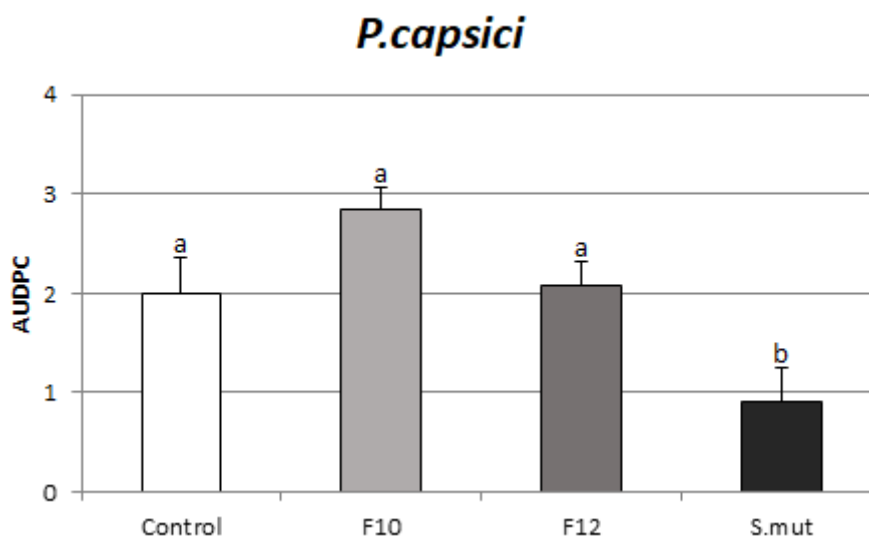


**Figura 3.** Peso fresco de plantas de pimiento tratadas con las fracciones de alpechín (F10 o F12) o el extracto de *Sargassum* (S.mut) a las 4 semanas de ser inoculadas con *Verticillium dahliae*. Solo los grupos que muestran el sufijo “Vd” han sido inoculados con *V.dahliae*. Se muestran las medias del peso fresco (FW) y el error estándar de dos experimentos independientes con 16 plantas en total por tratamiento (n=16). Control: Plantas tratadas con agua. F10: Plantas tratadas con la fracción purificada número 10 del alpechín. F12: Plantas tratadas con la fracción purificada número 12 del alpechín. S.mut: Plantas tratadas con el

extracto de *Sargassum muticum*. Letras diferentes indican diferencias significativas en un ANOVA y post-hoc LSD con un  $\alpha=0.05$ .

#### 4.2 *Sargassum muticum* protege frente a *P.capsici*

Se determino el nivel de daño causado en la planta por la infección de *P.capsici*, valorándose con niveles de 0 a 4 (correspondiendo 0 a ningún daño presente y 4 a la marchitez total de la planta). Se observa un descenso significativo de la severidad causada por la enfermedad de *P.capsici* en las plantas de pimiento tratadas con extracto del alga *S.muticum* (S.mut, figura 4). La fracción número 10 de alpechín (F10) parece incrementar la susceptibilidad de la planta a la infección causada por *P.capsici* aunque de manera no significativa. Por otra banda, la fracción número 12 de alpechín (F12) no produce ningún efecto sobre los síntomas causados por *P. capsici*.

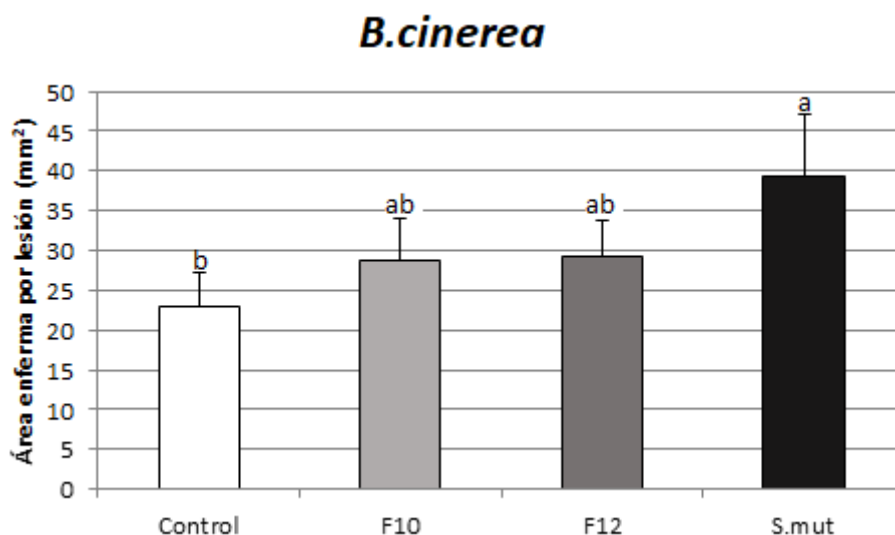


**Figura 4.** AUDPC de plantas tratadas con las fracciones de alpechín (F10 o F12) o el extracto de *Sargassum* (S.mut) durante las 72 horas post-inoculación con *P. capsici*. Se muestran las medias del índice de severidad en cada tratamiento y el error estándar de dos ensayos independientes con un total de 12 plantas por tratamiento (n=12). Control: Plantas tratadas con agua. F10: Plantas tratadas con la fracción purificada número 10 del alpechín. F12: Plantas tratadas con la fracción purificada número 12 del alpechín. S.mut: Plantas tratadas con el extracto de *Sargassum muticum*. Letras diferentes indican diferencias significativas en un tes de Kruskal-Wallis y un post-hoc de Conover con un  $\alpha=0.05$ .



### 4.3 *Sargassum muticum* favorece la enfermedad causada por *B.cinerea*

Se cuantificó el área afectada por la infección de *B. cinerea* en las plantas de cada tratamiento. Las plantas tratadas con el extracto del alga *Sargassum* (*S.mut*) tienen una mayor área foliar afectada que en las plantas control no inoculadas (figura 5). En los tratamientos con las fracciones de alpechín no se observa ninguna diferencia (F10 y F12, figura 5).

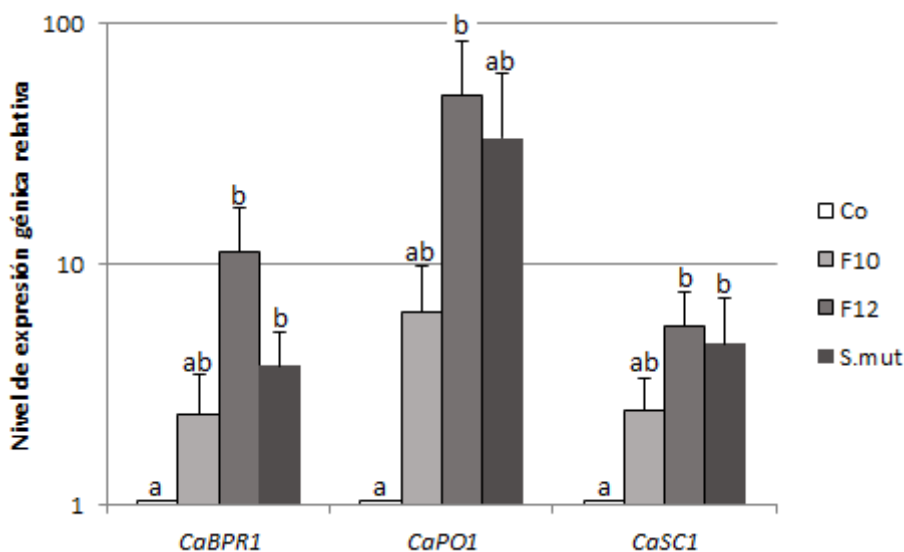


**Figura 5.** Área enferma por lesión en plantas tratadas con las fracciones de alpechín (F10 o F12) o el extracto de *Sargassum* (*S.mut*) a las 72 horas post-inoculación con *B.cinerea*. Se muestran las medias del área enferma por planta y el error estándar de dos ensayos independientes con un total de 32 lesiones por tratamiento (n=32). Control: Plantas tratadas con agua. F10: Plantas tratadas con la fracción purificada número 10 del alpechín. F12: Plantas tratadas con la fracción purificada número 12 del alpechín. S.mut: Plantas tratadas con el extracto de *Sargassum muticum*. Letras diferentes indican diferencias significativas en un ANOVA post-hoc LSD con un  $\alpha=0.05$ .

### 4.4 *Sargassum muticum* y la fracción de alpechín número 12 inducen genes de resistencia en *C. annuum*

Con este ensayo se busca observar si existen diferencias significativas en la expresión de tres genes implicados en la respuesta de la planta ante patógenos para los distintos tratamientos. Los genes estudiados han sido *CaBPR1*, *CaPO1* y *CaSCI*. El *CaBPR1* es una proteína PR1 básica que se acumula en gran variedad de plantas en respuesta a patógenos.

El *CaPO1* es una peroxidasa relacionada con defensa en procesos de endurecimiento de la pared celular. El *CaSC1* es una sesquiterpeno ciclasa implicada en la producción del compuesto antimicrobiano más importante de pimiento, el capsidiol. La fracción de alpechín número 12 (F12) produjo un incremento significativo en estos tres genes de defensa (figura 6). El extracto de *S.muticum* indujo dos de los genes de defensa, el *CaBPR1* y el *CaSC1* (figura 6). La fracción de alpechín número 10 (F10) no indujo significativamente ninguno de los tres genes estudiados.

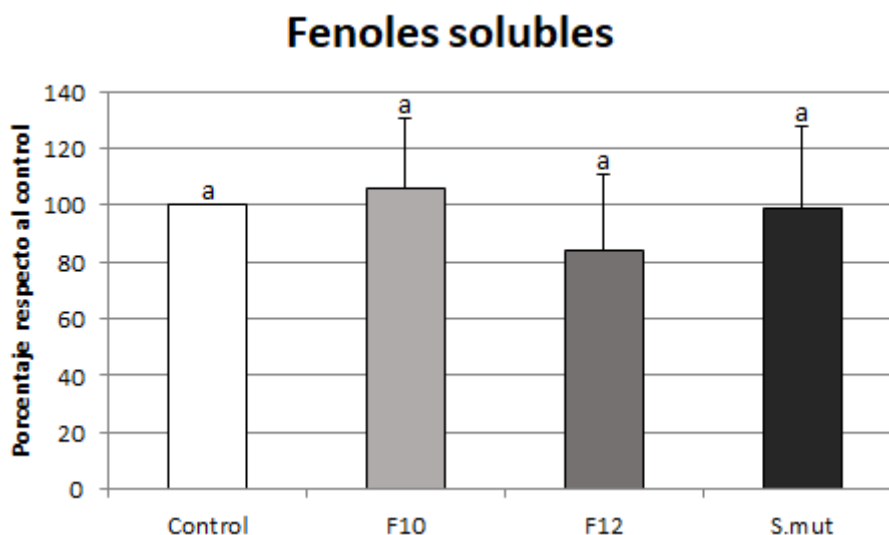


**Figura 6.** Nivel de expresión de los genes *CaBPR1*, *CaPO1* y *CaSC1* en raíces de plantas control, tratadas con las fracciones de alpechín (F10 o F12) o el extracto de *Sargassum* (S.mut) a las 24 horas tras los tratamientos. Se muestran las medias de la expresión de cada gen en cada tratamiento y el error estándar de cuatro ensayos independientes (n=4). Control: Plantas tratadas con agua. F10: Plantas tratadas con la fracción purificada número 10 del alpechín. F12: Plantas tratadas con la fracción purificada número 12 del alpechín. S.mut: Plantas tratadas con el extracto de *Sargassum muticum*. Letras diferentes indican diferencias significativas en un test de Kruskal-Wallis y un post-hoc de Conover con un  $\alpha=0.05$ .

#### 4.5 *Sargassum muticum* y las dos fracciones de alpechín no alteran el contenido en fenoles solubles totales

Se midió la concentración de fenoles presentes en las raíces de las plantas de pimiento tras el tratamiento con *S.muticum* o una de las dos fracciones de alpechín. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de fenoles en las raíces de las plantas a las 24 horas

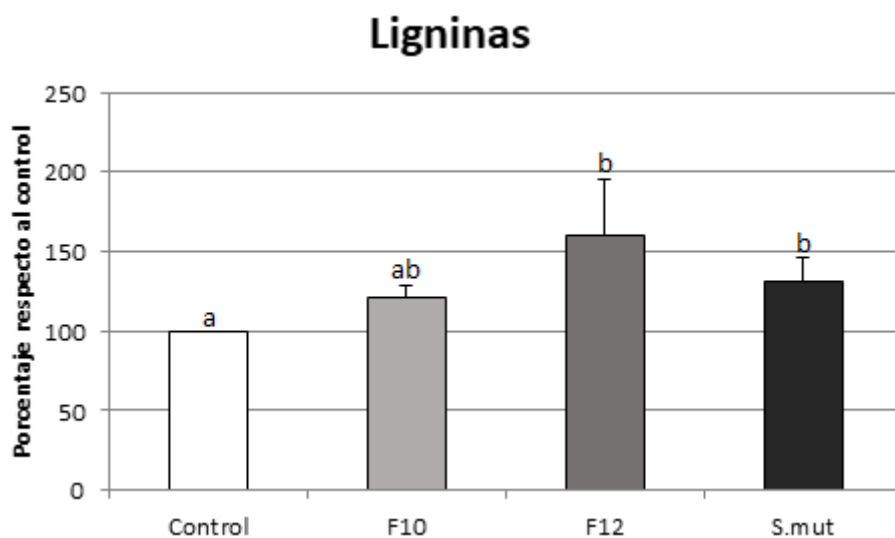
de ser tratadas (figura 7). La fracción de alpechín número 12 parece disminuir la cantidad de fenoles totales solubles en las raíces de *C. annuum*. Es necesario realizar nuevas medidas para incrementar la confianza del análisis.



**Figura 7.** Cantidad relativa (% respecto al control) de fenoles solubles en raíces de plantas control, tratadas con las fracciones de alpechín (F10 o F12) o el extracto de *Sargassum* (S.mut) a las 24 horas tras los tratamientos. Se muestran las medias y el error estándar de cuatro ensayos independientes (n=4). Control: Plantas tratadas con agua. F10: Plantas tratadas con la fracción purificada número 10 del alpechín. F12: Plantas tratadas con la fracción purificada número 12 del alpechín. S.mut: Plantas tratadas con el extracto de *Sargassum muticum*. Letras diferentes indican diferencias significativas en un test de Kruskal-Wallis y un post-hoc de Conover con un  $\alpha=0.05$ .

#### 4.6 *Sargassum muticum* y la fracción de alpechín número 12 provocan un aumento en el contenido en lignina

Se determinó la concentración de lignina presente en las paredes celulares de las raíces de *C. annuum* 24 horas tras el tratamiento con *S. muticum* o una de las dos fracciones de alpechín. Los tratamientos con *S. muticum* y la fracción 12 causaron un incremento significativo en el contenido en lignina en las raíces de *C. annuum* al tiempo estudiado (figura 8). En el caso de la fracción F10 el incremento no es significativo respecto al control, pero tampoco se diferencia de los otros tratamientos (figura 8). Ello sugiere la necesidad de realizar más ensayos.



**Figura 8.** Cantidad relativa (% respecto al control) de ligninas en raíces de plantas control, tratadas con las fracciones de alpechín (F10 o F12) o el extracto de *Sargassum* (S.mut) a las 24 horas tras los tratamientos. Se muestran las medias  $y \pm$  el error estándar de cuatro ensayos independientes ( $n=4$ ). Control: Plantas tratadas con agua. F10: Plantas tratadas con la fracción purificada número 10 del alpechín. F12: Plantas tratadas con la fracción purificada número 12 del alpechín. S.mut: Plantas tratadas con el extracto de *Sargassum muticum*. Letras diferentes indican diferencias significativas en un test de Kruskal-Wallis y un post-hoc de Conover con un  $\alpha=0.05$ .

## 5. DISCUSIÓN

Los experimentos de inducción de resistencia descritos en este trabajo, muestran que el extracto crudo de *Sargassum muticum* protege al pimiento (*C. annuum*) contra *V. dahliae* y *P. capsici*. En otros ensayos realizados se aprecia también el efecto de otras macroalgas en el proceso de inducción de resistencia ante estos patógenos. Los resultados de los experimentos realizados por Esserti *et al.* (2017) empleando extractos de tres algas pardas (*Cystoseira myriophylloides*, *Laminaria digitata* y *Fucus spiralis*) también indicaron un descenso de la actividad infecciosa del hongo *V. dahliae* en plantas de tomate, debido a una inhibición del crecimiento del micelio del hongo. Ensayos realizados con extractos del alga parda *Ascophyllum nodosum* en plantas de pepino aumentaron la resistencia a la infección causada por el hongo *Phytophthora melonis* (Abkhoo & Sabbagh, 2016).

Otros autores muestran en sus estudios la capacidad de otras especies de macroalgas para generar resistencia ante el hongo *B. cinerea* en plantas de otras especies de interés agrícola como el tomate (Sbaihat *et al.* 2014), la fresa (Righini *et al.* 2018) o en manzanos (Abouraicha *et al.* 2015). Sin embargo, en nuestro experimento se determinó que los extractos del alga parda *S. muticum* no protegen a las plantas de *C. annum* frente a la infección del hongo *B. cinerea*. Tampoco lo hacen las fracciones semi-purificadas de alpechín F10 y F12 empleadas para comprobar la efectividad del alga. Los resultados de este ensayo muestran un aumento en la actividad infecciosa del hongo *B. cinerea* cuando se aplica el extracto del alga *S. muticum*.

Una explicación de estos resultados sería el probable contenido en azúcares del extracto del alga, que ayudarían inicialmente a crecer a *B. cinerea*, pues en este caso tratamiento e inoculación se realizan en las hojas, que estarían impregnadas por ese extracto. En cambio, en el caso de los otros dos patógenos el tratamiento es en las hojas, pero la inoculación se produce en las raíces. Por otra parte, esta diferencia que se encuentra en la efectividad del extracto de *S. muticum* para producir resistencia en *C. annum* frente a los hongos *P. capsici* y *V. dahliae* y la ineficacia y aumento del efecto infeccioso causado por *B. cinerea*, puede deberse a la diferencia de estos tres hongos en su relación patológica con el hospedador. *P. capsici* y *V. dahliae* son hongos biotrofos, mientras que *B. cinerea* es un hongo necrotrofo. La planta presenta distintos mecanismos de defensa ante hongos que presentan una relación biotrofa o necrotrofa con el hospedador.

Ante el ataque de un fitopatógeno biotrofo se desencadena en la planta una respuesta hipersensible (HR) acompañada de un estallido oxidativo que lleva a la muerte celular programada de las células de la zona afectada de la infección. Esta respuesta se desencadena gracias al reconocimiento de efectores del patógeno en las células de la planta. Con este mecanismo de la HR, la planta frena al hongo privándolo del acceso al agua y a los nutrientes que necesita. Esta respuesta hipersensible permite también la activación de la ruta de señalización dependiente de la fitohormona ácido salicílico (SA). Esta ruta es la que activa la respuesta de defensa de la planta ante un patógeno biotrofo (Glazebrook, 2005). La proteína NPR1 es un regulador transcripcional que actúa aguas abajo del SA (Wu *et al.* 2012). Cuando los niveles de SA son bajos, NPR1 se encuentra en el citoplasma celular en forma de oligómero, pero cuando los niveles de SA aumentan, la proteína NPR1 se disocia en monómeros debido a la reducción de los enlaces disulfuro que mantienen unidos a los monómeros. Tras la disociación, los monómeros ingresan en el núcleo celular e interactúan con los factores de transcripción TGA, que activan diversos genes de defensa de la planta, como por ejemplo los genes que codifican para las proteínas de defensa PR (Zhou, 2014). Sin embargo, la respuesta de la planta ante un patógeno necrotrofo se produce mediante otra vía de señalización celular. En este caso, las vías del jasmonato (JA) y el etileno (ET) son las encargadas de activar los genes que permiten a la planta sintetizar las defensas necesarias. Spoel *et al.* (2003) habla acerca de la interacción inhibitoria entre las rutas de señalización del ácido salicílico y la del jasmonato y el etileno. Esta inhibición consiste en una represión mutua. En un experimento realizado con *Pseudomonas syringae* se bloqueó la acumulación de SA durante la infección, lo que resultó en una mayor expresión de los genes inducidos por JA. Spoel *et al.* (2003) también postulan que la misma proteína que actúa en la ruta de señalización del SA como factor de transcripción, actuaría en el proceso de represión de JA inducido por SA, pero con una función citosólica diferente a la nuclear en la activación de los genes de defensa en respuesta a SA.

Teniendo en cuenta los datos que se acaban de exponer, el extracto del alga *S.muticum* empleado en los experimentos realizados en este trabajo, probablemente haya activado la vía de señalización dependiente de SA en las plantas de pimiento. Una activación de esta vía dependiente de SA, llevaría a que la planta fuese más resistente a patógenos biotrofos o hemibiotrofos, como es el caso de *V. dahliae* y *P. capsici*. Al mismo tiempo, la activación de esta ruta estaría inhibiendo las vías de señalización del JA/ET, lo que llevaría a una disminución en la respuesta al ataque de un patógeno con un modo de vida necrotrofo, como

es el caso de *B. cinerea*. Ante el ataque de un biotrofo, suele también producirse la activación de la respuesta hipersensible en la zona afectada. Esta respuesta hipersensible llevaría a la consecuente muerte celular que frenaría la expansión de la infección producida por el biotrofo. Sin embargo, esta muerte celular facilitaría aún más la infección de un hongo necrotrofo, ya que obtiene los nutrientes que necesita de células muertas de la planta infectada. Este puede ser el principal motivo por el que, en los experimentos, las plantas muestren un aumento en la resistencia a *V. dahliae* y *P. capsici* y sean más susceptibles a la infección por *B. cinerea*.

Los experimentos realizados en este ensayo también muestran un aumento en la expresión de *CaPRI*, *CaSCI* y *CaPOI*, tres genes relacionados con la defensa de la planta ante el ataque de un patógeno. En los experimentos anteriormente citados (Esserti *et al.* 2017; Abkhoo & Sabbagh, 2016; Sbaihat *et al.* 2014; Righini *et al.* 2018; Abouraicha *et al.* 2015) se producía la activación de genes que codifican para proteínas PR, como es el caso de *CaPRI*, que codifica para la proteína PR-1, una proteína con capacidad para secuestrar los esteroides necesarios para las membranas celulares de los patógenos. Cook *et al.* (2018) también describe el aumento de la expresión de los genes que codifican para la proteína PR-1 en *Arabidopsis thaliana* empleando un extracto del alga parda *Ascophyllum nodosum* (Stella Maris®). La actividad antimicrobiana de PR-1 es especialmente importante en el caso de los oomicetos, ya que estos no tienen la capacidad para sintetizar esteroides. Esta síntesis de proteínas PR-1 sería una de las razones de la disminución de la infección del hongo *P. capsici* respecto a las plantas control, ya que *P. capsici* es un oomiceto. En el caso del gen *CaSCI*, codifica para una sesquiterpeno ciclasa, implicada en la producción del capsidiol. El capsidiol es una fitoalexina con actividad antimicrobiana producida por las plantas de *C. annuum* en respuesta a patógenos, como *P. capsici* o *V. dahliae* (Veloso *et al.* 2014). Esserti *et al.* (2017) también referencio un aumento de las enzimas peroxidasas respecto al control de los patógenos. Peng *et al.* (2004) observaron también el aumento de enzimas peroxidasas causadas por la aplicación de ácido salicílico a plantas de tomate. En nuestro caso tenemos un aumento de la expresión del gen *CaPOI* que codifica para peroxidasas implicadas en la defensa y en los procesos de endurecimiento de la pared celular (García *et al.*, 2018).

El extracto crudo de *S. muticum*, así como la fracción semi-purificada de alpechín F12, producen en las plantas de *C. annuum* un aumento en la concentración de lignina en las paredes celulares de las células de la raíz de la planta. La pared celular es una importante línea de defensa contra patógenos fúngicos. Una de las respuestas de la planta frente a la

infección por un patógeno es el proceso de lignificación, que permite crear barreras y frenar la expansión de la infección de la planta (Doughari, 2015). A mayores, impide el libre movimiento de nutrientes, lo que causa la inanición del patógeno (Doughari, 2015). Jones & Dangl (2006) citan numerosos ejemplos del efecto del aumento de lignina a la hora de frenar el avance de las infecciones de distintos patógenos fúngicos sobre diferentes cultivos como la patata, el pepino, la zanahoria y el trigo. Por tanto, el incremento de la concentración de lignina estaría contribuyendo al aumento de la resistencia de la planta frente a los patógenos estudiados en este ensayo.

En resumen, las plantas de *C. annuum* experimentan un aumento de la resistencia a las infecciones de *V. dahliae* y *P. capsici* probablemente debido a la activación de la vía dependiente de SA y el consecuente aumento de la expresión de los genes *CaPRI*, *CaPOI* y *CaSCI*. Por el contrario, la resistencia a *B. cinerea* disminuye notablemente debido al efecto inhibitorio de la ruta de SA sobre la ruta JA/ET, viéndose además favorecida la infección de *B. cinerea* por la acción de la respuesta hipersensible. Sería interesante comprobar los niveles de defensa en hojas tratadas con los tres inductores ensayados, así como determinar los niveles de hormonas en las diferentes partes de la planta.

Hay pocos estudios realizados en plantas de *C. annuum* sobre la resistencia inducida empleando elicitores que provengan de algas como es el caso de *S. muticum* o de otro tipo de alternativa a los pesticidas de síntesis empleados para reducir el impacto de los fitopatógenos en los cultivos de interés comercial. Sería conveniente proseguir los estudios con mayor hincapié en la actualidad, ya que hay una incipiente necesidad de sustituir a los pesticidas de síntesis por nuevos agentes de control eficaces que no sean dañinos para el medio ambiente y que incluso aumenten la sostenibilidad, como en el caso de las fracciones de alpechín, al emplear el residuo de la producción del aceite de oliva. Otro de los aspectos que todavía no está muy claro es el proceso de inhibición que se produce entre las vías de señalización del SA y las del JA/ET. Sería interesante seguir profundizando en ello, ya que es importante para la síntesis de elicitores naturales. No sería efectivo que un elicitor proteja contra un patógeno si provoca un aumento en las infecciones producidas por un segundo patógeno en las plantas. Estos dos aspectos me parecen los puntos fundamentales en los que se deberían centrar futuras investigaciones en este campo.



## 6. CONCLUSIONES

1. El extracto crudo de *Sargassum muticum* protege a pimiento (*C. annuum*) contra *V.dahliae* y *P.capsici* pero incrementa la enfermedad causada por *B.cinerea*. La fracción semi-purificada de alpechín número 12 (F12) protege a pimiento frente a *V. dahliae* pero no contra *P.capsici* o *B.cinerea*. Por último, la fracción semi-purificada de alpechín número 10 (F10) no protege a pimiento (*C. annuum*) contra ninguno de los patógenos estudiados.

2. Los tratamientos con el extracto crudo de *Sargassum muticum* y la fracción semi-purificada de alpechín número 12 (F12) inducen los mecanismos de defensa de la planta. Concretamente, los genes de defensa de pimiento *CaBPR1* y *CaSCI* y las ligninas incrementan sus niveles con ambos tratamientos, mientras que la expresión de *CaPO1* solo lo hace con la fracción semi-purificada de alpechín número 12 (F12). El tratamiento de la planta con la fracción semi-purificada de alpechín número 10 (F10) no induce significativamente los mecanismos de defensa estudiados. El contenido en fenoles no se ve afectado por ninguno de los tres tratamientos usados.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Asturnatura.com (2004). “*Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt”. Asturnatura.com [en línea]. Num. 3, 26/12/04 [consultado el 18/06/2019]. Disponible en <https://www.asturnatura.com/especie/sargassum-muticum.html>. ISSN 1887-5068.
- Abkhoo J & Sabbagh S.K. (2016). Control of *Phytophthora melonis* damping-off, induction of defense responses, and gene expression of cucumber treated with commercial extract from *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology*. 28:1333-1342.
- Abouraicha E, El Alaoui-Talibi Z, El Boutachfai R, Petit E, Courtois B, Courtois J, & El Modafar C. (2015). Induction of natural defense and protection against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae. *Scientia Horticulturae*. 181:121-128.
- Baudoin W, Grafiadellis M, Jiménez R, La Malfa G, Martínez-García P.F, Monterio A.A, Nisen A, Verlodt H, Villele O, Van Zabeltitz Ch, & Garnaud J.C. (2002). El cultivo protegido en clima mediterráneo. Estudio FAO producción y protección vegetal. 90: 202-214.
- Casares C, Gómez A, Ribera M. A, & Seoane J (1987). *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, nueva cita para la Península Ibérica. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Barcelona. *Collectanea Botanica*. 17:151.
- Cook J, Zhang J, Norrie Jeff, Blal B, & Cheng Z. (2018). Seaweed extracts (Stella Maris®) activates innate immune responses in *Arabidopsis thaliana* and protects host against bacterial pathogens. *Marine Drugs*. 16(7): 221, doi: 10.3390/md16070221.
- Cooper R.M. (2000). *Advances in Verticillium research and disease management*. St Paul, MN, USA. APS Press.
- Diaz J, Silvar C, Varela M, Bernal A, & Merino F. (2005). Fusarium confers protection against several mycelial pathogens of pepper plants. *Plant Pathology* 54, 773-780.
- Doughari J.H. (2015). An overview of plant immunity. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. 6:11 DOI: 10.4172/2157-7471.1000322.
- Elad Y, Vivier M, & Fillinger S. (2015). *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Switzerland. Springer.

- Erwin D.C, & Ribeiro O.K. (1996) *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota, USA. The American Phytopathological Society.
- Esserti S, Smaili A, Rifai L.A, Koussa T.M, Akroum K, Belfaiza M, Kabil E.M, Faize L, Burgos L, Albuquerque N, & Faize M. (2017). Protective effect of three Brown seaweed extracts against fungal and bacterial diseases of tomato. *Journal of Applied Phycology*. 29:1081-1093.
- Fao.org (2017). FAOSTAT. [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> [Consultado el 10 Jun. 2019].
- Fry S.C. (1988). *The growing plant cell wall: Chemical and metabolic analysis*. Essex, Reino Unido. Longman Scientific and Technical.
- 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.
- García T, Veloso J & Díaz J. (2018). Vanillyl nonanoate induces systemic resistance and lignification in pepper plants. *Journal of Plant Physiology*, 231: 251-260.
- Gayoso C, de Ilárduya O, Pomar F & Merino de Cáceres F. (2007). Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 118:199-209.
- Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43:205-227.
- Hoagland, DR & Arnon, DI (1950). The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular, 347.
- Jones J.D, Dangl J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*. 444: 323-329
- Keen NT & Bruegger B. (1977). *Phytoalexins and chemicals that elicit their production in plants. Host Plant Resistance to Pests*, American Chemical Society Washington, DC, USA. P. A. Hedin Ed.
- Koornneef A, & Pieterse C.M.J. (2008). Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*, 146, 839–844.

- Lamour KH, Stam R, Jupe J, & Huitema E. (2011). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*. 13: 329-337.
- Lyon G. (2007). *Induced Resistance for Plants Disease Control: a Sustainable Approach to Crop Protection*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 9-29.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2019). Mapama.gob.org. [En línea] Disponible en [https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad\\_diferenciada/dop/hortalizas/DOP\\_pimiento\\_herbon.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad_diferenciada/dop/hortalizas/DOP_pimiento_herbon.aspx) [Consultado el 11 de junio de 2019].
- Ministerio para la Transición Ecológica (2019). Catálogo español de especies exóticas invasoras. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/especies-exoticas-invasoras/ce-eei-catalogo.aspx> [Consultado el 11 de junio de 2019].
- Pardo C, Veloso J, & Diaz J. (2014). Aplicaciones de las algas marinas como fitofortificantes: un remedio natural para combatir infecciones de hongos en plantas de cultivo. pp 967-979. En: *Propostas agroecológicas ao industrialismo. Recursos compartidos e respostas colectivas*. Xavier Simón Fernández e Damián Copena Rodríguez (eds.). Grupo de Investigación en Economía Ecológica e Agroecología, España.
- Pegg G.F. (1974). Verticillium diseases. *Review of Plant Pathology* 53, 157–182.
- Peng J, Deng X, Huang J, Jia S, Miao J, & Huang Y. (2004). Role of salicylic acid in tomato defense against cotton bollworm, *Helicoverpa armígera* Hubner. *Zeitschrift fur Naturforschung*. 59:856-862.
- Pérez-Cirera JL, Cremades J, & Barbara I. (1989). Precisiones sistemáticas y sinecológicas sobre algunas algas nuevas para Galicia o para las costas atlánticas de la Península Ibérica. *Anales Jard. Bot. Madrid*. 46(1): 35-45.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: e45.
- Pieterse CMJ, & Dicke, M. (2007). Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends in Plant Science*. 12, 564–569.

- Righini H, Roberti R, & Baraldi E. (2018). Use of algae in strawberry management. *Journal of Applied Phycology*. 30: 3551–3564.
- Sbaihat L, Takeyama K, Koga T, Takemoto D, Kawakita K (2015). Induced resistance in *Solanum lycopersicum* by algal elicitor extracted from *Sargassum fusiforme*. *The Scientific World Journal*. 2015: 870520.
- Shekhar Sharma HS, Fleming C, Selby C, Rao JR, & Martin T (2013). Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology* 26:465-490.
- Silvar C., Merino F & Díaz J. (2009). Resistance in pepper plants induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* involves different defence-related genes. *Plant Biology*, 11: 68-74.
- Singleton VL, & Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- Van Kan J, Shaw M. & Grant-Downton R. (2014). Botrytis species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue?. *Molecular Plant Pathology*, 15, 957–961.
- Veloso, J. & Díaz, J. (2012). *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defense genes. *Plant Pathology*, 61: 281-288.
- Veloso J, Prego C, Varela MM, Carballeira R, Bernal A, Merino F, & Díaz J. (2014). Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. *Plant Biology*. 16:177-185.
- Vera J, Castro J, González A, & Moenne A (2011). Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Marine Drugs* 9:2514-2525.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan AL. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*. 8: 561-580.
- Wu Y, Zhang D, Chu J.Y, Boyle P, Wang Y, Brindle I.D, De Luca V, & Després C. (2012). The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Reports* 28:639-647.

Zhou N, Tootle T.L, Tsui F, Klessig D.F, & Glazebrook J. (1998). PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell*. 10:1021-1030.