

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Estudo do efecto de dous tipos de extractos de *Moringa oleifera* sobre o crecemento de callos de *Capsicum annuum*
L. var. *annuum*

Estudio del efecto de dos tipos de extractos de *Moringa oleifera* sobre el crecimiento de callos de *Capsicum annuum*
L. var. *annuum*

Study of the effect of two types of extracts of *Moringa oleifera* on the growth of callus of *Capsicum annuum* L. var. *annuum*

Ana Seijo Torreiro

Febrero, 2020

Director Académico: Dra Ángeles Bernal Pita da Veiga

Facultad de Ciencias

TRABALLO FIN DE GRAO

Dña. María de los Angeles Bernal Pita da Veiga, autoriza a presentación do Traballo de Fin de Grao "Estudo do efecto de dous tipos de extractos de Moringa oleifera sobre o crecemento de callos de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*", presentado por Ana Seijo Torreiro para a súa defensa ante o tribunal cualificados

En A Coruña a 20 de febreiro del 2020.

Fdo.: Angeles Bernal Pita da Veiga

Resumo

Analizamos o efecto de dous tipos de extractos obtidos a partir de follas de *Moringa oleifera*, sobre o crecemento de callos de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. Os resultados obtidos mostran que ambos os dous tipos de extractos, nas concentracións analizadas, non teñen un efecto positivo sobre o incremento en peso fresco medido aos 28 días da experiencia. Con obxecto de valorar se a adición destes extractos ao medio de cultivo de callos podía estar a disparar un mecanismo de resposta de defensa, decidimos analizar o comportamento de tres enzimas relacionadas coa detoxificación de especies áctivas de osíxeno. Con independencia do tipo de extracto analizado, observamos un incremento respecto ao control, no tres enzimas ensaiadas. No caso do extracto eMo H₂O observamos un aumento importante na actividade peroxidasa, mostrando os callos tratados con extracto eMo Et 80 os valores máis altos de catalasa e ascorbato peroxidasa.

Resumen

Hemos analizado el efecto de dos tipos de extractos obtenidos a partir de hojas de *Moringa oleifera*, sobre el crecimiento de callos de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. Los resultados obtenidos muestran que ambos tipos de extractos, en las concentraciones analizadas, no tienen un efecto positivo sobre el incremento en peso fresco medido a los 28 días de la experiencia. Con objeto de valorar si la adición de estos extractos al medio de cultivo de callos, podía estar disparando un mecanismo de respuesta de defensa, decidimos analizar el comportamiento de tres enzimas relacionadas con la detoxificación de especies activas de oxígeno. Con independencia del tipo de extracto analizado, hemos observado un incremento respecto al control, en las tres enzimas ensayadas. En el caso del extracto eMo H₂O hemos observado un aumento importante en la actividad peroxidasa, mostrando los callos tratados con extracto eMo Et 80% los valores más altos de catalasa y ascorbato peroxidasa.

Abstract

We have analysed the effect of two types of extracts obtained from leaves of *Moringa oleifera*, on the growth of callus of *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. The results obtained show that both types of extracts, in the concentrations analysed, do not have a positive effect on the increase in fresh weight measured to the 28 days of the experience. Wich object to value if the addiction of these extracts to the médium culture of callus, could be shooting a mechanism of defence response, we decide to analyse the behaviour of three enzymes related with the detoxification of oxygen actives species. With independence of the type of extract analysed, we have observed an increase relation to the control, in the three enzymes tested. In case of the eMo H₂O extract we have observed an important increase in the peroxidase activity, showing the callus treated with eMo Et 80% extract the highest values of catalase and ascorbate peroxidase.

Índice

<i>Capsicum annuum</i>	3
Cultivo <i>in vitro</i>	4
Callos	5
Especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo	5
Enzimas antioxidantes	6
Peroxidasas	6
Catalasa.....	7
Ascorbato peroxidasa.....	7
<i>Moringa oleifera</i> Lam.....	8
Objetivos.....	9
Material y Métodos.....	10
Material vegetal	10
Reactivos.....	10
Inicio de Vitro-Plant	10
Esterilización del material vegetal	10
Preparación de medios	10
Inicio de Vitro-plant.....	11
Preparación de medios para la inducción de callo	11
Inducción de callo	11
Obtención de extractos de Moringa	12
Preparación de medios para analizar el efecto de los diferentes tipos de extractos de <i>Moringa</i>	12
Repicado de callo en medios elicitados	13
Medición de peso fresco	13
Preparación y conservación de las muestras.....	13
Homogenización, centrifugado y diálisis de las muestras	13
Medida de actividad peroxidasa.....	13
Medida de la actividad catalasa	14
Medida de la actividad ascorbato peroxidasa	14
Resultados y discusión.....	14

Obtención de Vitro plant.....	14
Obtención de callos y repicado	15
Preparación de medios de cultivo con diferentes tipos de extractos de Moringa oleifera e inicio del experimento.....	16
Evaluación del incremento en peso fresco.....	19
Medida de enzimas antioxidantes	20
Peroxidasa.....	20
Enzima catalasa.....	21
Enzima ascorbato peroxidasa.....	22
Conclusiones	23
Bibliografía	24

Capsicum annuum

La mayor parte de los cultivos existentes de pimiento pertenecen al género *Capsicum annuum*, familia *Solanaceae*. Las especies de *Capsicum* fueron introducidas en Europa desde América siendo originarias de América Central y del Sur. Se trata de las primeras hortalizas empleadas como condimentos (Rodríguez & Depestre, 2007).



Figura 1. Áreas de distribución mundial actuales de *C. annuum*.

Este género comprende cerca de 27 especies, cinco de las cuales han sido domesticadas: *C. annuum* (L), *C. baccatum* (L), *C. chinense* (Jacq), *C. frutescens* (L) y *C. pubescens* (R & P) (Rodríguez & Depestre, 2008). De todas estas, *Capsicum annuum* L. es la especie más cultivada y con mayor importancia económica, presentando variedades picantes y no picantes (Marcos Pérez, 2013).

Respecto a su morfología, es una planta herbácea o arbustiva cuyo tallo puede alcanzar hasta 2 metros de altura. Sus flores son hermafroditas y de tonos blancos, mientras que sus frutos consisten



Figura 2. Imagen de un cultivo de pimiento tomada de:

<https://www.lospimientosdepadron.com/es/content/10-proceso-de-cultivo-pimiento-herbon-padron>

en bayas comestibles, carnosas o secas (Hanan et al., 2009). Las semillas por fruto son numerosas, de color amarillo y aplanadas.

Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* o micropropagación es una técnica desarrollada para la producción en masa de plantas, que ha sido utilizada con éxito desde los años 60 (Cañal et al., 2001). Este método se basa en cultivar fragmentos pequeños de tejidos y órganos en medios nutritivos óptimos, los cuales permitan el desarrollo celular y el crecimiento adecuado del material vegetal.

Las características principales de este método residen en la capacidad de clonar material vegetal en condiciones de asepsia y en poder controlar las condiciones externas que afectan al crecimiento. Los objetivos de la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes: algunos ejemplos son la propagación de plantas, estudios básicos de fisiología y genética o bioconversión y obtención de productos útiles (Mroginski & Roca, 1991).

Sin embargo, no deja de ser un complejo proceso por la dificultad de reproducir a nivel de laboratorio, las condiciones naturales en las que crece habitualmente la planta. Así como, también es difícil el hecho de suministrarle al explante (fragmento u órgano a partir del cual se inicia el cultivo) lo necesario para su correcto desarrollo.

En resumen, la técnica consta de 5 fases diferenciadas que se pueden resumir en:

- 0: Selección y preparación de la planta madre
- 1: Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas
- 2: Introducción del material seleccionado *in vitro*
- 3: Multiplicación de brotes
- 4: Enraizamiento
- 5: Aclimatación

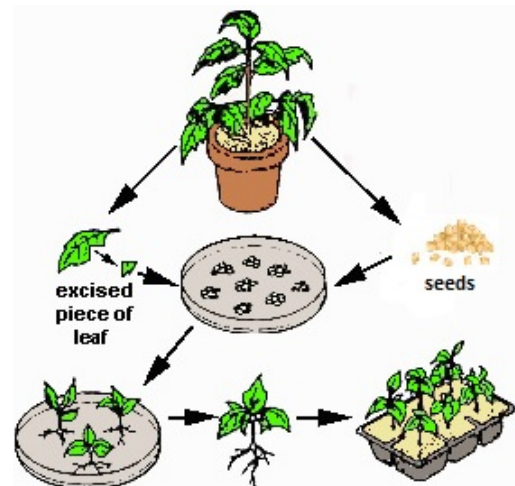


Figura 3. Imagen editada que resume el proceso de micropropagación, original extraída de: <http://www.pharmatips.in/Articles/Plant-Tissue-Culture.aspx>

Callos

Los callos están constituidos por células totipotentes indiferenciadas que se dividen activamente, formando una masa amorfa. No tienen patrones predecibles de organización y están presentes en centros localizados de actividad meristemática (Billard, 1995).

El estado de totipotencia lo consiguen invirtiendo el proceso natural de diferenciación que ocurre durante el crecimiento y desarrollo de la planta. Con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos, dependiendo fundamentalmente del balance auxina-citoquinina en el medio de cultivo (Franklin, 2003).

Los callos se obtienen de explantes extraídos de órganos o tejido, siendo los más adecuados los que provienen de plantas jóvenes. Inicialmente, crecen asociados al tejido original en un medio nutritivo a base de agar suplementado con hormonas como la kinetina o el 2,4-D. Algunos desarrollos de callos son fuertemente lignificados y duros en textura, por lo que no se pueden separar fácilmente en pequeños fragmentos. Por el contrario, los callos frágiles se separan fácilmente y se les denomina cultivos friables (Lallana, 2003). En general, el tejido calloso es un material celular de gran utilidad a la hora de llevar a cabo estudios bioquímicos o en producción de metabolitos secundarios, así como paso previo a la iniciación de suspensiones celulares.

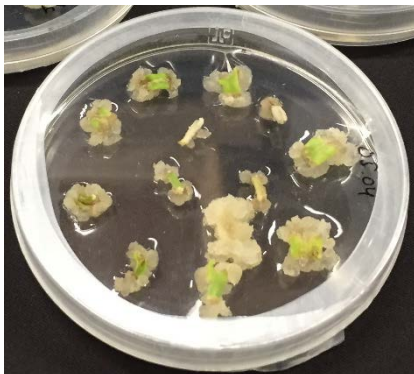


Figura 4. Imagen de callos en fase inicial, obtenidos a partir de explantes de tallos y ápices de plantas de Capsicum annum.

Especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son producidas como una consecuencia del metabolismo aeróbico (Carvajal, 2018). Las ROS son moléculas químicamente reactivas que contienen O, así como iones que contienen O y los peróxidos; destacan el peróxido de hidrógeno H_2O_2 , y los

radicales hidroxilos (OH^-) y superóxido (O_2^-). Su alta reactividad en el tejido vegetal se debe a la presencia de electrones no apareados en la capa de valencia.

Las ROS se forman como subproductos metabólicos y actúan como mensajeros en procesos de señalización celular y homeostasis. Un balance entre la producción de las ROS y su eliminación permite una función celular normal, mientras que un desequilibrio causa estrés oxidativo (Carvajal, 2019)

El estrés oxidativo provoca daño celular, ya que niveles elevados de ROS oxidarían los componentes vitales de las células. Además, es sabido que se produce bajo condiciones de estrés abiótico (luz, temperatura, humedad...). Para combatir al estrés y al exceso de ROS celular, aparece el sistema de defensa antioxidante, constituido por un grupo de sustancias que se encargan de reaccionar con las ROS para que éstas últimas no interactúen con los componentes celulares.

Enzimas antioxidantes

Peroxidasas

Las peroxidasas (EC. 1.11.1.7) (H_2O_2 : donador de hidrógeno: H_2O_2 oxidorreductasas), constituyen un grupo de enzimas cuya función primaria es la de oxidar diversos sustratos a expensas del H_2O_2 en dos pasos consecutivos monoeléctricos (Barbeito, 2000).

Aparecen en un amplio abanico de organismos, pero las peroxidasas vegetales son conocidas como las PRX clase III. Se localizan en las vacuolas y paredes celulares, tienen estructura monomérica y, normalmente, están glicosiladas.

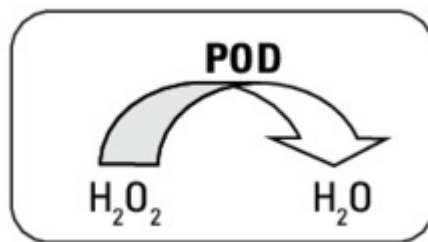


Figura 5. Conversión del peróxido de hidrógeno a H_2O catalizado por peroxidasa.

Durante su ciclo regulan y catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno tomando electrones de varias moléculas donantes que pueden ser fenoles, precursores de lignina o metabolitos secundarios (Machado et al., 2013). Así, se encargan de eliminar el peróxido del entorno celular (el cual puede ser dañino para la planta) y, durante el estado de oxidación intermedia, aprovechan la capacidad oxidante para desempeñar funciones metabólicas.

Las peroxidasas van a estar implicadas en una amplia gama de procesos fisiológicos tales como lignificación, suberización, metabolismo de auxinas, entrecruzamiento de proteínas de la pared celular, tolerancia a sales, estrés oxidativo, y defensa contra el ataque de patógenos (Tognolli et al., 2002).

Catalasa

Dentro del sistema antioxidante se encuentran las enzimas antioxidantes, como la catalasa (CAT), una enzima tetraédrica, dependiente del grupo hemo. Se localiza a nivel celular en mitocondrias, peroxisomas y citosol. Presenta 2 funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se encarga de catalizar la descomposición del H_2O_2 , un compuesto tóxico a niveles elevados, en agua y oxígeno. Existen dos grupos principales de catalasas, en función del tamaño de sus subunidades.

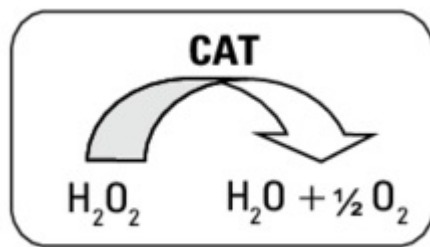


Figura 6. Reacción enzimática catalizada por la CAT.

Ascorbato peroxidasa

Un sistema eficiente en las plantas lo constituye el sistema ácido ascórbico y la enzima ascorbato peroxidasa. La APX se encarga de eliminar el H_2O_2 transformándolo a H_2O , utilizando el ascorbato como sustrato para la reacción. Actúa principalmente en el citosol y el cloroplasto.

El MDA producido en la reacción es un radical libre perjudicial, pero tras varias conversiones secuenciales mediadas por enzimas da lugar a $NADP^+$. La APX junto con otro grupo de enzimas como la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa (GR) y el ascorbato y glutatión, forma parte del ciclo del ascorbato-glutation o ciclo de Halliwell-Asada-Foyer (García Sánchez, 2011).



Figura 7. Reacción enzimática catalizada por la APX.

A diferencia de la peroxidasa, esta enzima muestra una mayor afinidad de sustrato por el peróxido de hidrógeno, lo que provoca que a bajas concentraciones de ROS sea más efectiva en la regulación de sus niveles. Existen estudios que evidencian el aumento de la APX en plantas sometidas a condiciones de estrés abiótico (Miller et al., 2007)

Moringa oleifera Lam.

El árbol de *Moringa oleifera* tiene su origen en la región noroeste de la India, al sur de las Montañas del Himalaya (Foidl et al., 2001). Hoy en día también podemos encontrarla ampliamente distribuida tanto en África como en América, en climas tropicales y subtropicales.

Pertenece a la familia de las Moringáceas, es de tipo perenne y crece con relativa facilidad. Su altura oscila entre los 7 y 10 metros, pudiendo alcanzar hasta 12, y sus frutos y hojas son comestibles. Las hojas, en concreto, son especialmente ricas en vitaminas y aminoácidos, aunque las semillas maduras también son aprovechables en alimentación, ya que contienen un alto porcentaje de aceite.

Por otra parte, también se le atribuyen usos tan diversos como la producción de biodiesel y biogás, adsorción de metales pesados, tratamiento de aguas o fertilizante. Debido a esto, es conocida como el árbol de la vida. Ha sido identificada por numerosos investigadores como una planta con beneficios para la salud, por sus características nutricionales y medicinales (Razis-Abdull et al., 2014). También se le atribuye actividad antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria.



Figura 8. Imagen de la distribución mundial de *M. oleifera*. Fuente: http://www.treesforlife.org/sites/default/files/images/Moringa_worldmap.jpg



Figura 9. Hojas, fruto y semillas de *Moringa oleifera* L. Fuente: <https://www.moringa10.com/motivos-para-tomar-moringa/>



Figura 10. Valores nutricionales comparativos entre 100 gr de hoja seca de moringa y alimentos comunes (Olson, 2011).

Actualmente, *Moringa oleifera* es una planta que presenta un alto potencial biotecnológico debido a su elevado contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos (Torres-Castillo et al., 2013). En las dos últimas décadas, se ha incrementado su estudio y son, cada día más abundantes, las investigaciones en las que se la hace partícipe.

Las hojas de *Moringa oleifera* presentan compuestos antioxidantes, reguladores de crecimiento, proteínas, vitaminas, aminoácidos, sales minerales e inclusive agentes antimicrobianos. Su incorporación a los medios de cultivo de callos de pimiento puede suponer un aporte adicional de nutrientes, que puede favorecer su crecimiento, acortando el período de desarrollo de los mismos.

Objetivos

En este trabajo se estudiará la capacidad biofortificante de extractos de hoja de *Moringa oleifera* Lam. sobre callos de pimiento, analizando el crecimiento de los mismos a lo largo de un periodo de 28 días. Con objeto de valorar el posible efecto estresante que supone adicionar estos extractos, analizaremos la actividad de enzimas detoxificadoras de especies activas de oxígeno.

Los principales objetivos de este trabajo serán:

- Inicio de una línea celular de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* para obtener callos y adicción a los medios de cultivo de dos tipos de extractos de *Moringa oleifera*, con el objetivo de evaluar su posible efecto sobre el crecimiento de los callos.
- Análisis de la respuesta de los callos al posible efecto estresante mediante la valoración de la actividad de enzimas detoxificadoras de especies activas de oxígeno: peroxidasa, catalasa y ascorbato peroxidasa.

Material y Métodos

Material vegetal

Hemos utilizado semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) que aportó el grupo de FISAPLANT de Fisiología Vegetal de la UDC. Las semillas de *Moringa oleífera* fueron adquiridas a la empresa Vitalmor y cultivadas en la cámara de cultivo e invernadero de la Facultad de Ciencias

Reactivos

En esta experiencia todos los reactivos utilizados en las diferentes preparaciones y mediciones fueron de la marca Sigma-Aldrich.

Inicio de Vitro-Plant

Esterilización del material vegetal

Las semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) se introducen en un vaso de precipitados que contenga etanol al 70% durante 2 minutos en el agitador. Pasado este tiempo, se pasan las semillas a un vaso con hipoclorito sódico (lejía) al 20% durante 20 minutos, también en el agitador. Posteriormente, y ya en la cámara de flujo laminar, se somete a las semillas a 3 lavados consecutivos con agua destilada estéril y se depositan en un papel, también estéril, para secar.

Preparación de medios

VITRO-PLANT (para 200 ml de medio)	
Murashige y Skoog	0,92 g
Sacarosa	6 g
Caseína	50 mg
Vitaminas de Morel	0,2 ml
Agar	1,6 g

Cantidades utilizadas para la preparación de 200 ml de medio.

Tras pesar todos los elementos necesarios, reservamos el agar y el resto se vierten en un vaso de precipitados de 250 ml en el que previamente se añaden 150 ml de agua destilada. Seguidamente

se lleva la mezcla al agitador y se ajusta el ph hasta 5,8. Después, se enrasa con agua destilada hasta 200 ml, se añade el agar y se autoclava.

Inicio de Vitro-plant

En cuanto el medio está autoclavado y las semillas desinfectadas y secas, se vierte el medio en unos botes de cristal con cierre hermético. Con el medio ya endurecido, se colocan las semillas con cierta separación entre ellas formando un círculo. Se cierra y sella el bote con parafilm y se repite el proceso hasta tener todos los botes preparados. Finalmente, los botes son llevados a la cámara de cultivo, donde se dan las condiciones ideales para que las semillas puedan germinar pasada una semana.

Preparación de medios para la inducción de callo

Murashige y Skoog	2.3 g
Sacarosa	15 g
Caseína	125 mg
Vitaminas de Morel	0.5 ml
Kinetina (100 mg/l)	0.250 ml
2,4-D(2,4- Ácido diclorofenoxiacético) (3 g/l)	7.5 ml
Agar	4 gr

Cantidades para la preparación de 500 ml de medio.

Inducción de callo

Una vez hayan germinado las semillas y pasados diez días, se obtienen las plántulas óptimas a partir de las cuales es inducido el callo. Para ello, en la cámara de flujo laminar se extraen los brotes que tengan tallos y hojas jóvenes. En una placa Petri, se corta el brote con ayuda de un bisturí y unas pinzas en fragmentos de aproximadamente medio centímetro. Estos fragmentos son llevados a otra placa que contenga el medio suplementado con 2,4 D y Kinetina para lograr la desdiferenciación del tejido vegetal. Se cierran y sellan las placas cerradas con parafilm y se incuban en oscuridad durante 4 semanas.

Obtención de extractos de *Moringa*

Se recogieron las hojas de *Moringa oleifera* Lam. de plantas cultivadas en el invernadero de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña. Primero, se les aplicó una deshidratación permaneciendo durante 72 horas en la estufa a 70 grados. Con ayuda de un mortero, el material vegetal seco se trituró hasta conseguir un polvo homogéneo.

El extracto etanólico se preparó mezclando 50 mg de polvo de *Moringa* con 2,5 mL de etanol al 80%. A continuación se introdujo la muestra en un termobloque a 50 grados durante 15 minutos, se dejó enfriar en agua otros 5 minutos. Finalmente, la muestra se filtró a través de papel de laboratorio.

El extracto acuoso se preparó añadiendo 50 mg de polvo de *Moringa* a 2,5 ml de agua. La muestra se calentó en un termobloque a 100°C durante 15 minutos y, posteriormente, se dejó enfriar 5 minutos en agua. Finalmente, se filtró a través de papel de laboratorio y se pasó por un filtro de 0,22 µm de diámetro.

Preparación de medios para analizar el efecto de los diferentes tipos de extractos de *Moringa*

El repicado del callo se realiza en placas en las que al medio basal se le ha añadido los dos tipos de extractos que hemos preparado. Esto es, un extracto etanólico de hojas de *Moringa* y un extracto acuoso. Para ello se preparan 500 ml de medio base como anteriormente se realizó para la inducción de callo y se le añaden los diferentes extractos en las cantidades indicadas en la siguiente tabla. Preparamos 3 controles, uno que sólo es medio basal, otro etanol 80% y agua.

Medio 1: Control	100 ml de medio base
Medio 2: Agua destilada	100 ml medio base + 0,5 ml H ₂ O destilada
Medio 3: Extracto acuoso de Mo	100 ml medio base + 0,5 ml extracto acuoso de <i>Moringa</i>
Medio 4: Etanol 80%	100 ml medio base + 0,5 ml etanol 80%
Medio 5: Extracto EtOH de Mo	100 ml medio base + 0,5 ml extracto etanólico de <i>Moringa</i>

De esta forma se obtienen 4 medios diferentes y un control, a partir de los cuales se preparan 20 placas Petri en total (4 por cada medio) para realizar el repicado.

El conjunto de procesos se lleva a cabo bajo condiciones de esterilidad, en cámara de flujo laminar, para evitar posibles alteraciones en los medios que, en consecuencia, podrían dar lugar a una posterior contaminación de los callos.

Repicado de callo en medios elicitados

El repicado se realiza a partir de los callos inducidos anteriormente y en condiciones de esterilidad. En la cámara de flujo laminar y con ayuda de un bisturí, se extrae cuidadosamente de la placa una porción de callo de aproximadamente 150 miligramos y se repica en una placa con medio fresco nuevo. La placa se cierra y se sella con parafilm para ser incubada. Se realiza para todas las placas igual y, antes de incubarlas, se pesan para hacer un seguimiento de la evolución del peso fresco de los callos.

Medición de peso fresco

Tras iniciar el período de incubación, los callos se pesan a tiempo 0 y a los 7, 14, 21 y 28 días. Las pesadas se realizan sin extraer el callo de la placa, excepto la pesada final que es doble, pesándose el callo con la placa incluida y una vez extraído. Para llevar a cabo el pesaje se despegan los callos de sus respectivos agaros cuidadosamente y se llevan a la balanza.

Preparación y conservación de las muestras

Una vez extraídos y pesados de forma individual, las muestras de cada tratamiento con pesos superiores a 2 gramos se empaquetan en papel albal, se clasifican por grupos en bolsas plásticas herméticas y se conservan a -4 grados durante 24 h.

Homogenización, centrifugado y diálisis de las muestras

Pasadas las 24 horas, se retiran las muestras del congelador. Para la homogeneización se prepara un mortero en una cubeta con hielo, ya que a lo largo de todo el proceso debe mantenerse la cadena de frío, extrayéndose las muestras en un tampón EDTA 1mM Tris 50mM KCl 1mM en proporción 1:2 (p/v).

Una vez homogeneizado, se filtra con ayuda de dos gasas frías la mezcla y se centrifuga durante 30 min a 4°C y 12000rpm. Después de la centrifugación se recoge el sobrenadante de cada muestra para ser dializado. La purificación de las muestras se hace por cromatografía sobre Sephadex G-25, equilibrada en tampón Tris-HCl 50mM pH 7,5 utilizando una columna PD-10 de Pharmacia. El dializado se recogió en tubos graduados y se conservó otras 24 horas a -4 °C.

Medida de actividad peroxidasa

La actividad catalasa se determinó de acuerdo con el método de Ferrer et al. (1990). La determinación de la actividad peroxidasa se realizó midiendo los incrementos de absorbancia de

las muestras en un intervalo de 3 minutos mediante un espectrofotómetro ThermoElectronCorporation. Las cubetas se preparan con tampón Tris HCl 50mM pH 5, 4-metoxi- α -naftol 1 Mm, H₂O₂ 0,5mM y 50 μ l de muestra. Las actividades se calcularon en nkat/gr peso fresco, mediante un coeficiente de extinción molar de 21,6 M⁻¹.cm⁻¹.

Medida de la actividad catalasa

La actividad catalasa se determinó de acuerdo con el método de Aebi (1984) con ligeras modificaciones, basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240nm motivada por la desaparición del H₂O₂. El ensayo se efectuó mediante un espectrofotómetro ThermoElectronCorporation. La mezcla de reacción contenía tampón Fosfato Potásico 50mM pH 7, H₂O₂ 10.6mM y 100 μ l de extracto en un volumen final de 1ml. La actividad enzimática se calculó a partir de un coeficiente de extinción molar para el H₂O₂ de 39.58 M⁻¹.cm⁻¹.

Medida de la actividad ascorbato peroxidasa

La actividad ascorbato peroxidasa se ensayó espectrofotométricamente según el método descrito por Asada y col. (1994) que consiste en la medida a 290nm de la oxidación del ácido ascórbico. La mezcla de reacción contenía tampón Fosfato potásico 50mM, Ascórbico 0.5 mM, H₂O₂ 0.1 mM y 50ml de muestra. El ensayo se efectuó mediante un espectrofotómetro ThermoElectronCorporation. La actividad enzimática se calculó a partir de un coeficiente de extinción molar 2.8 mM⁻¹.cm⁻¹ (Hossain et al., 1984)

Resultados y discusión

Obtención de Vitro plant

El proceso comienza con la esterilización de las semillas, las cuales se empaquetan en una gasa con ayuda de un clip para ser sometidas a los lavados de etanol al 70% y de hipoclorito sódico al 20 %. Seguidamente, se llevan a la cámara de flujo laminar donde se realizan tres lavados consecutivos con agua destilada estéril. Por último, se abre la gasa y se colocan en un papel estéril en la cámara para dejarlas secar durante 30 minutos. Con ayuda de unas pinzas, se colocan las semillas en el interior del recipiente que contiene medio de cultivo sin hormonas, trazando un círculo y dejando una ligera separación entre ellas. El último paso consiste en cerrar los botes con parafilm e introducirlos en la cámara de cultivo, donde permanecerán dos semanas, apreciando los primeros brotes a los 8 días.



Figura 11. Semillas de C. annuum envueltas para el proceso de desinfección.



Figura 12. Vitro plant.

Obtención de callos y repicado

Pasadas dos semanas, las semillas germinan y se obtienen las plántulas de pimiento (*Capsicum annuum L.*) a partir de las cuales se induce el callo. Las plántulas deben presentar el tamaño necesario como para poder realizar cortes en sus órganos de aproximadamente medio centímetro.

En la cámara de flujo laminar se abren los botes y, con ayuda de unas pinzas y un bisturí, se extraen los brotes de los que se desprecian las raíces. Se hacen cortes en tallo, hojas jóvenes y ápices, que serán usados como explantes. Los fragmentos ya cortados se disponen en placas Petri que contienen medio sólido al que se le ha añadido 2,4-D y kinetina. Se sigue el mismo patrón de colocación, fragmentos dispuestos dibujando un círculo y con cierta separación entre ellos. Para mantener las condiciones de asepsia, se cierran y sellan las placas en la cámara de flujo y se cultivan en oscuridad.

Tras 10 días de cultivo, en los extremos de los explantes aparece una masa indiferenciada de células. Esta masa es el callo que se deja crecer hasta pasadas 3 semanas, momento en el que se extrae de los explantes con un bisturí y se pasa al centro de una placa Petri con medio fresco. Se repite el proceso de sellado y cultivo de las placas para que continúe el desarrollo del callo.

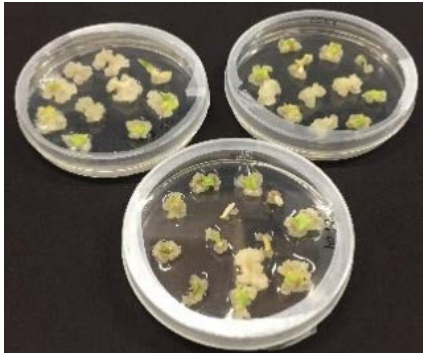


Figura 13. Primeros callos obtenidos a partir de explantes de Vitro Plant, en placas con medios suplementado con hormonas.

Preparación de medios de cultivo con diferentes tipos de extractos de Moringa oleifera e inicio del experimento

El repicado del callo en los medios suplementados con diferente tipo de extracto se realiza de la misma forma que explicado anteriormente, con la simple variación de la composición de los medios a los que se le añaden medio basal, un control de agua, un control de Etanol 80% y los dos tipos de extractos (en lo sucesivo eMo H₂O, eMo Et 80%).

Para ello, se prepara el medio base y se suplementa, se reparte en las placas Petri y se deja solidificar en la cámara de flujo laminar. Una vez solidificado, se repican aproximadamente 150 miligramos de callo en cada placa. Se preparan 4 placas por cada tipo de medio y para el control, se cierran y sellan en la cámara y se incuban en oscuridad durante 28 días.

Periódicamente se revisan las placas para comprobar que los callos evolucionan favorablemente y que no aparece contaminación por hongos en ellos. También se realiza un pesado semanal para observar las variaciones en el peso y así determinar cómo varía el peso fresco.

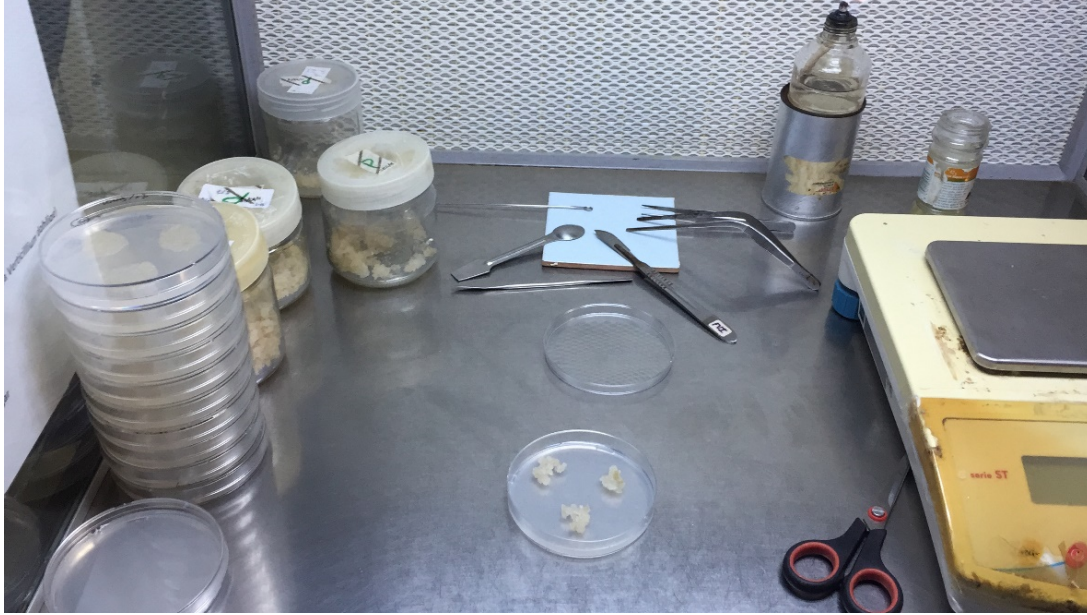


Figura 14. Proceso de preparación de los diferentes tipos de medios de cultivo.

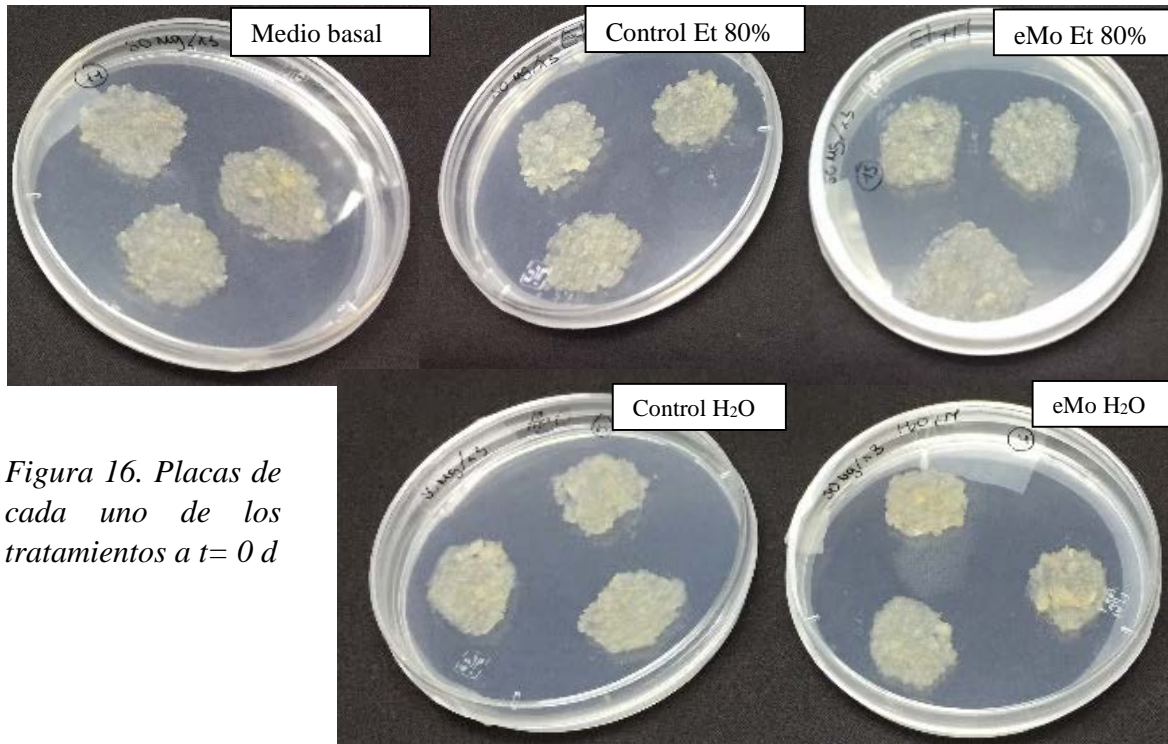


Figura 16. Placas de cada uno de los tratamientos a $t=0$ d

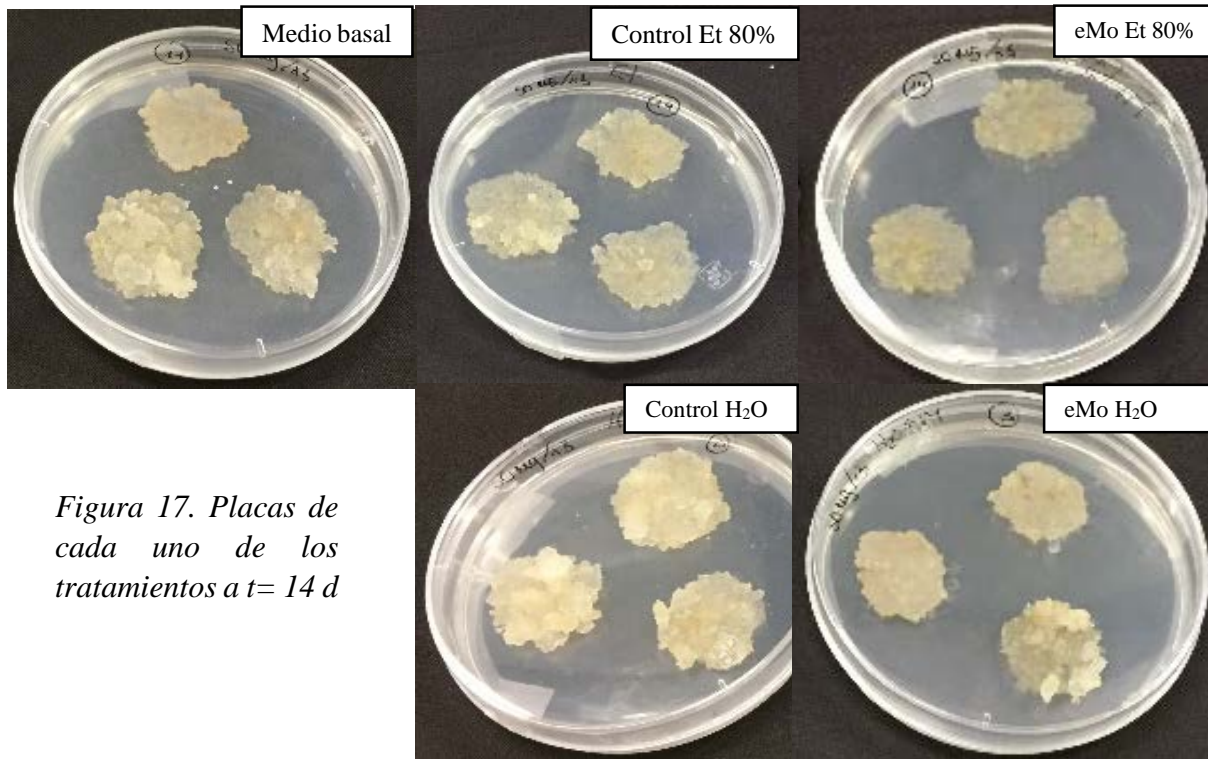


Figura 17. Placas de cada uno de los tratamientos a t= 14 d

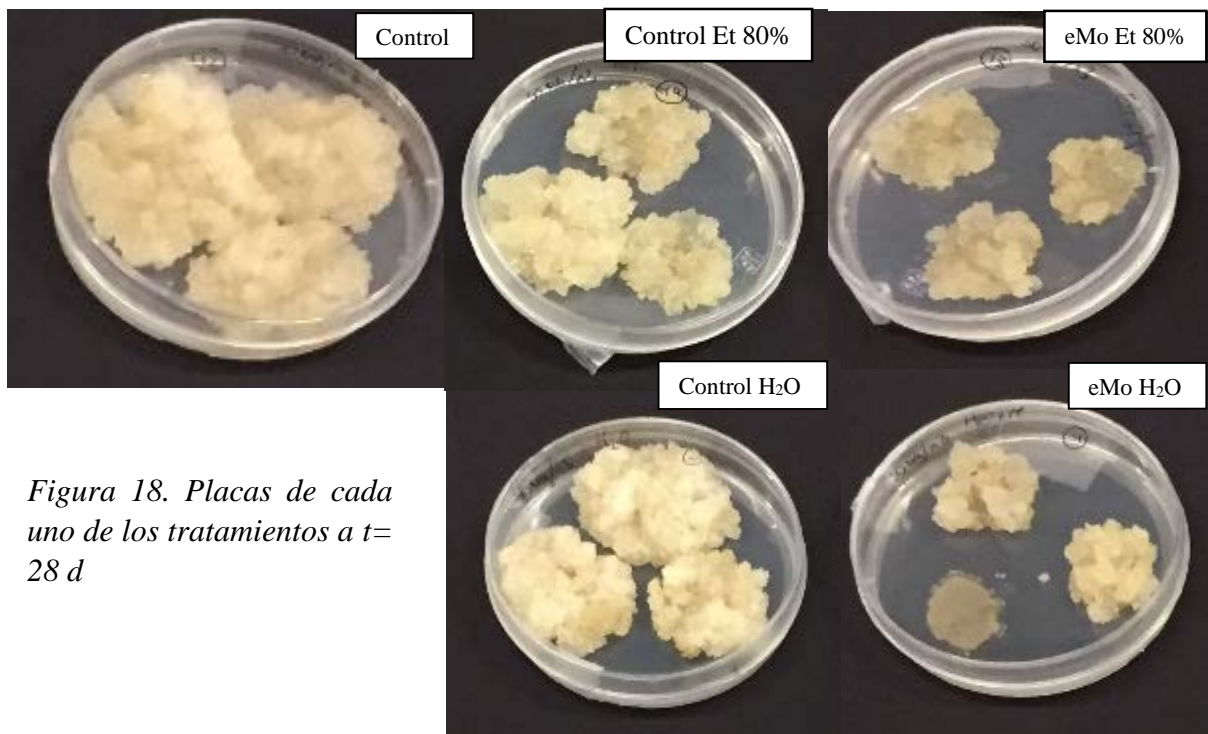


Figura 18. Placas de cada uno de los tratamientos a t= 28 d

Evaluación del incremento en peso fresco

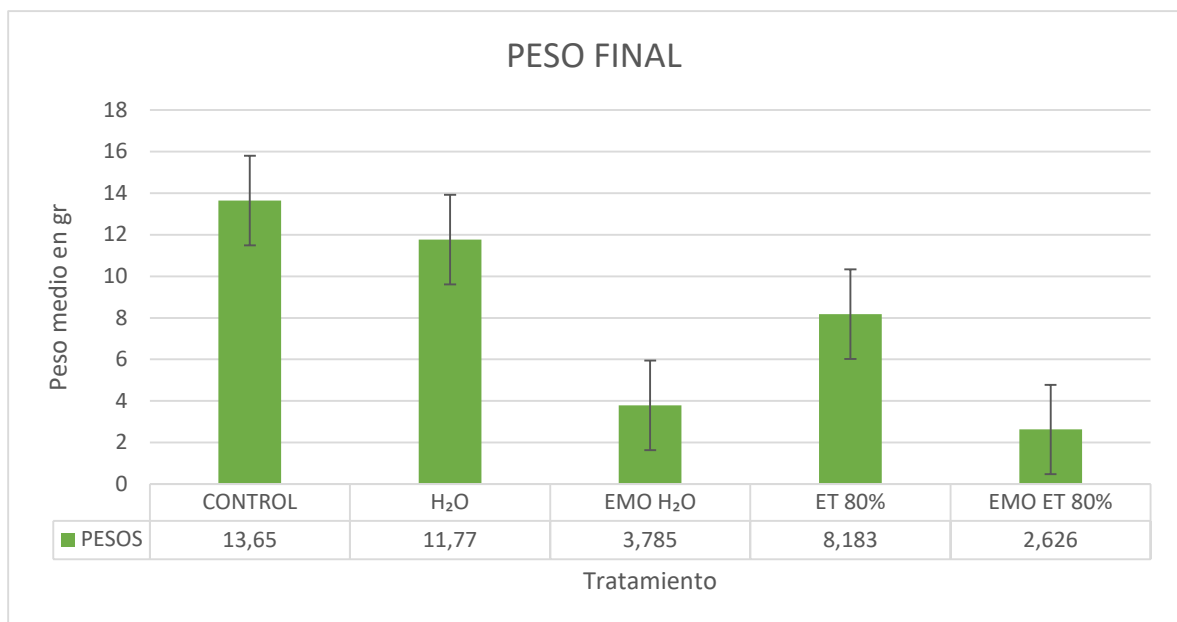
Al término del experimento se observa que los que han alcanzado mayor tamaño corresponden a los tratamientos control seguido de los controles de H₂O y Et 80%. Dentro de este grupo, los callos sometidos al tratamiento acuoso y etanólico sin enriquecer con *Moringa*, tienen un volumen similar pero, en general, presenta mejor aspecto el callo sometido a etanol ya que el tratamiento acuoso se encuentra más seco.

El tratamiento de extracto etanólico con *Moringa* tiene una placa con algo más de crecimiento que las otras de su mismo grupo, casi el doble en gramos, pero aun así no es comparable al crecimiento que han mostrado los callos tratados con extracto acuoso o los callos control.

El tratamiento acuoso con *Moringa* llega al final de la experiencia con solo dos placas, ya que las otras dos fueron descartadas por aparecer en ellas contaminación. Se observa un tamaño mucho menor del callo comparado con el resto de placas, incluso comienzan a aparecer hongos en uno de ellos.

En la gráfica 1, se puede observar el incremento en peso fresco al cabo de 28 días.

Gráfica 1. Peso medio final de los callos, según el tratamiento aplicado.



Al observar la gráfica se ven resultados positivos en los callos control. En cuanto a los callos con medio enriquecido con extracto acuoso y etanólico de *Moringa*, el acuoso supera por aproximadamente 1,1 gramos de media al tratamiento etanólico.

Estudios realizados in vitro plantas de banano en fases de aclimatación (Ugarte-Barco et al., 2018), mostraron efectos positivos en cuanto al efecto fortificante del extracto de *Moringa* al aplicar

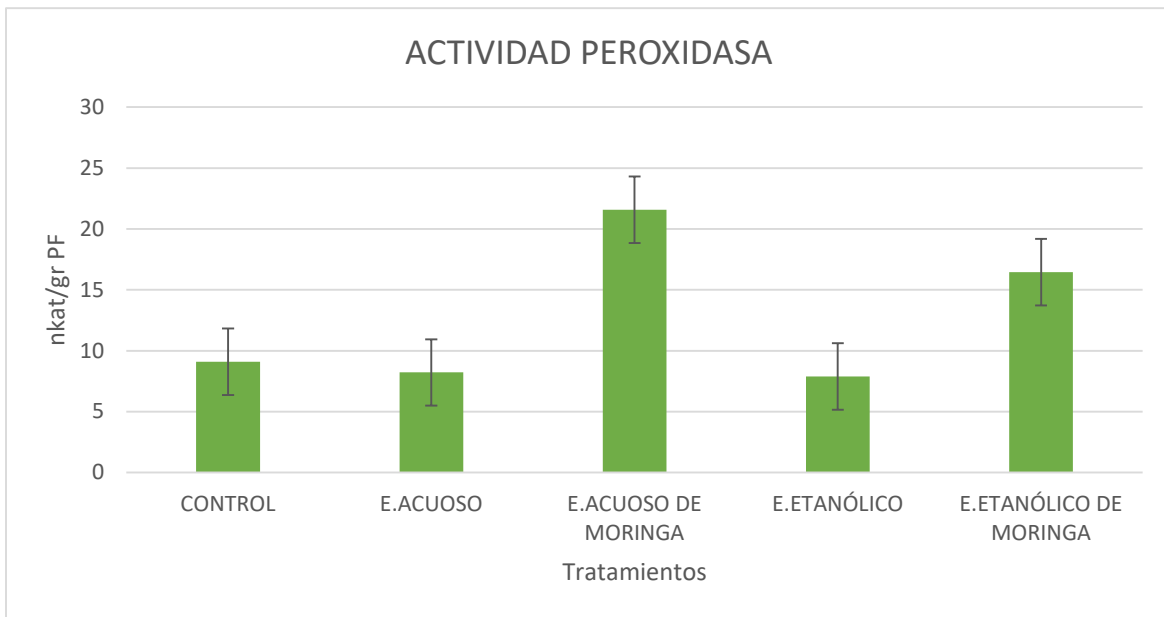
extractos acuosos elaborados a partir de la hoja con concentraciones del 60 al 75 %. Se pudo observar tanto la formación de nueva materia celular tras 14 días de evaluación así como la formación final de materia seca. También se demostró su capacidad antioxidante en situaciones de estrés abiótico. Los datos mostrados en nuestro estudio, revelan que ambos tipos de extractos (eMo H₂O y eMo Et 80%) no tienen efecto positivo sobre el crecimiento de los callos. Es más, diríamos que tienen efecto negativo porque en ninguno de los dos casos se refleja un incremento positivo del peso. Esta respuesta podría estar relacionada con que no estamos añadiendo la concentración óptima o que se está produciendo una situación de estrés.

Por esta última razón, decidimos analizar la respuesta de las enzimas peroxidasa, catalasa y ascorbato peroxidasa. Dichas enzimas forman parte de los mecanismos detoxificadores de ROS en las células vegetales.

Medida de enzimas antioxidantes

Peroxidasa

En la gráfica 2 se presentan los resultados obtenidos al medir la actividad peroxidasa de las muestras sometidas a diferentes tipos de tratamiento después de un periodo de 28 días.



Gráfica 2. Diferentes actividades de la enzima peroxidasa, expresadas por tratamiento en nkat/gr Peso fresco.

En este caso, podemos observar que los tratamientos control y con extracto sin enriquecer presentan unos niveles similares de actividad peroxidasa. En cambio, los tratamientos con *Moringa* tienen una mayor actividad, incluso el doble en el caso del extracto acuoso respecto a los controles.

Los resultados podrían estar indicando una situación de estrés oxidativo, ya que son los extractos con *Moringa* los que presentan una mayor actividad peroxidasa.

Salleres (2005) analizó el sistema peroxidasa en callos y suspensiones de *Capsicum chinense* Jack a lo largo del desarrollo. Sus resultados muestran que ambos sistemas son equiparables, y que no existen cambios relevantes entre callos y suspensiones, pudiéndose utilizar indistintamente. Este resultado coincide con los obtenidos por Tomé (2019) en suspensiones celulares de pimiento, en dónde analiza como un extracto acuoso de hojas de *Moringa*, estimula la actividad peroxidasa en el medio extracelular.

Enzima catalasa

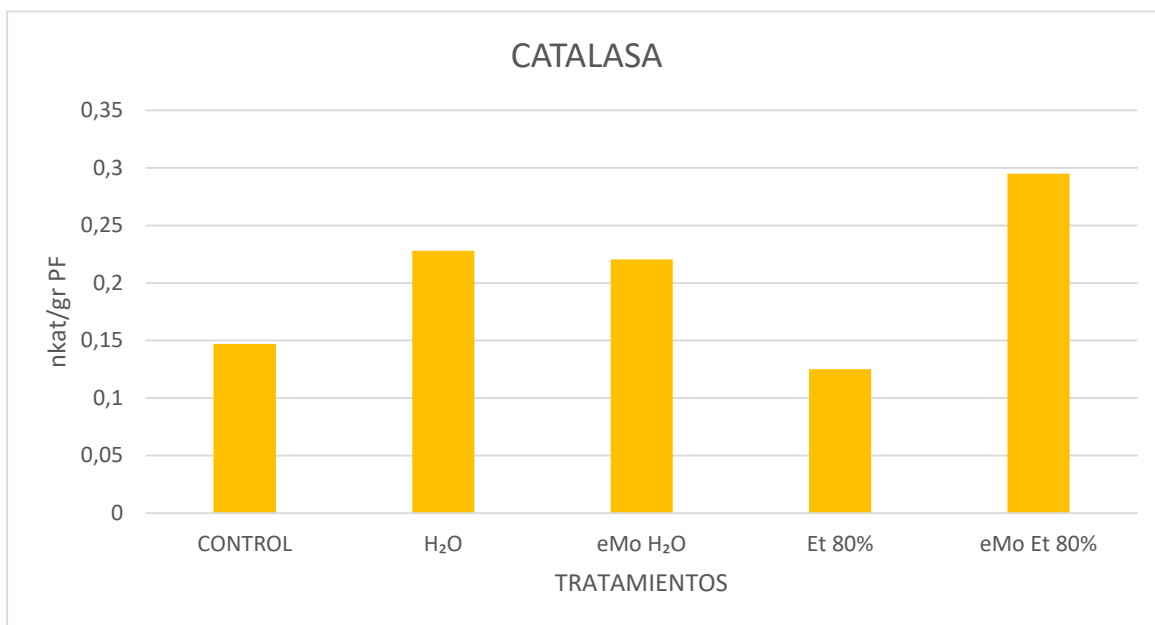


Gráfico 3. Actividad catalasa presente en las muestras de cada tratamiento, expresadas en nkat/gr peso fresco.

En cuanto a la actividad catalasa, esta se determinó en base a un análisis espectrofotométrico midiendo la disminución de la absorbancia, en intervalos de 1,5 minutos, motivada por la desaparición del H₂O₂. Las muestras utilizadas para la prueba fueron las no dializadas, es decir, los extractos brutos que no se pasaron a través de las columnas de exclusión molecular PD-10 Sephadex G-25. La actividad se expresa en nkat/gr de peso fresco, siendo el Katal la unidad que determina la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un mol de sustrato por segundo.

Así, podemos ver en la gráfica 3 que la muestra con mayor actividad se corresponde con la estimulada con extracto etanólico de *Moringa*, seguida de las de extracto acuoso, ambas muy

parejas. Las muestras de control y control de etanol presentan niveles inferiores de actividad catalasa y resultados similares.

Enzima ascorbato peroxidasa

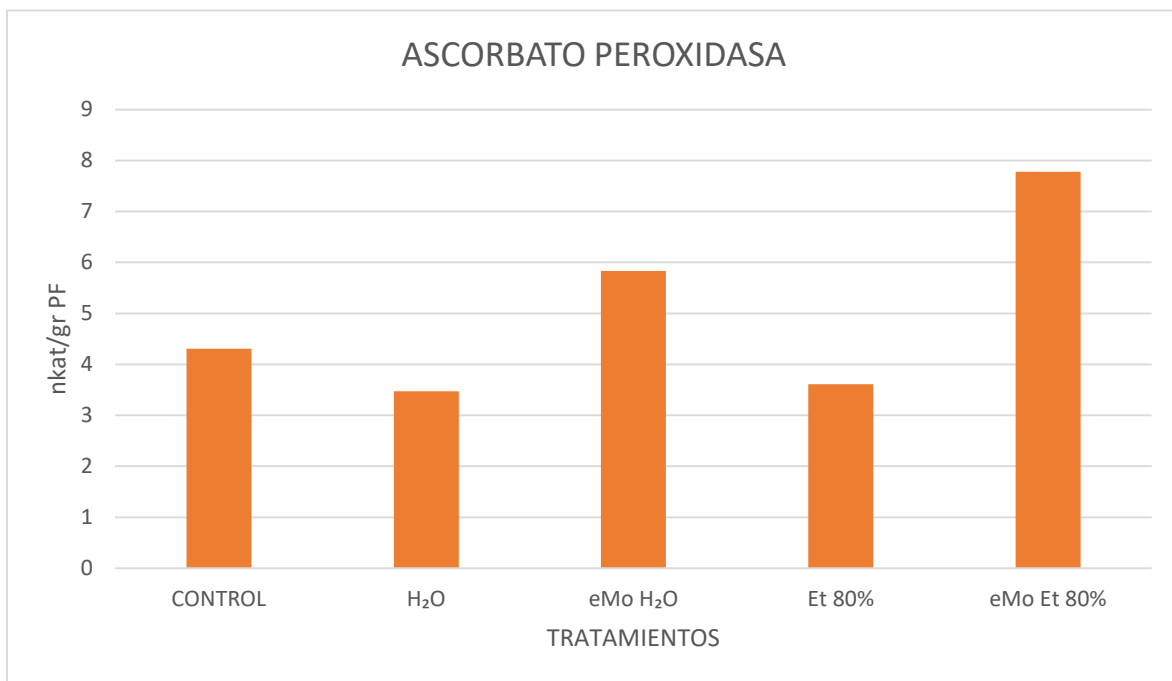


Gráfico 4. Actividad ascorbato peroxidasa de cada tratamiento, expresadas en nkat/gr peso fresco.

Para realizar la medición de la actividad ascorbato peroxidasa se realizó un ensayo espectrofotométrico a 290 nm en función de la oxidación del ácido ascórbico. En este caso, las muestras empleadas para el análisis sí habían sido dializadas mediante PD-10 Sephadex G-25. La actividad se expresa en nkat/gr Peso fresco.

En la gráfica 4 se puede observar que ambos tratamientos enriquecidos con extracto de *Moringa* reflejan una mayor actividad enzimática que sus respectivos controles. En cuanto a los controles, es el de medio basal el que tiene una ligera mayor actividad que los de extracto acuoso y etanólico.

Estudios previos realizados en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la UDC, han puesto en evidencia la capacidad de extractos de *Moringa oleifera* de elicitar la respuesta de defensa en suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. Dicha respuesta está relacionada con un aumento en la síntesis de compuestos fenólicos, parejo a un incremento en la capacidad antioxidante en el espacio extracelular de las suspensiones junto con un aumento en la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta.

En este trabajo se estudia el efecto de dos tipos de extractos obtenidos a partir de hojas de *Moringa oleifera*, sobre el crecimiento de callos de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. Los resultados

obtenidos, muestran que ambos tipos de extractos, en las concentraciones analizadas, no tienen un efecto positivo sobre el incremento en peso fresco medido a los 28 días de la experiencia.

Con objeto de analizar si la adición de estos extractos al medio de cultivo de callos, podía estar disparando un mecanismo de respuesta de defensa, decidimos analizar el comportamiento de tres enzimas relacionadas con la detoxificación de especies activas de oxígeno: peroxidasa, catalasa y ascorbato peroxidasa.

Con independencia del tipo de extracto analizado, hemos observado un incremento respecto al control, en las tres enzimas ensayadas. En el caso del extracto eMo H₂O hemos observado un aumento importante en la actividad peroxidasa. Este resultado coincide con los obtenidos por Tomé (2019) en suspensiones celulares de pimiento, en donde analiza como un extracto acuoso de hojas de *Moringa*, estimula la actividad peroxidasa en el medio extracelular. En el caso de la catalasa y la ascorbato peroxidasa, los valores más altos de actividad, se han observado en los callos tratados con extracto eMo Et 80%. López (2019) ha podido comprobar como la elicitación con extracto eMo Et80% incrementaba la producción de compuestos fenólicos y la expresión del gen CaBPR1 (que codifica para una proteína básica 1 relacionada con la patogénesis). Cabe esperar que este aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes, pueda estar relacionado con una respuesta de defensa de los callos frente al extracto eMo Et80%.

Conclusiones

En este trabajo se estudia el efecto de dos tipos de extractos obtenidos a partir de hojas de *Moringa oleifera*, sobre el crecimiento de callos de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*.

Los resultados obtenidos, muestran que ambos tipos de extractos, en las concentraciones analizadas, no tienen un efecto positivo sobre el incremento en peso fresco medido a los 28 días de la experiencia.

Con independencia del tipo de extracto analizado, hemos observado un incremento respecto al control, en las tres enzimas ensayadas. El extracto etanólico de *Moringa* provoca un aumento importante en la actividad peroxidasa, mientras que el extracto acuoso de *Moringa* afecta a la actividad catalasa y ascorbato peroxidase.

Bibliografía

- AEBI H. 1984. Catalase in vitro. En: *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- BARBEITO, F. P. (2000). Caracterización de la actividad peroxidasa implicada en los procesos de lignificación y su estudio en la interacción: *Capsicum annum* L. var *annuum*-*Verticillium dahliae* Kleb. A Coruña.
- BILLARD, C. (1995). Inducción de callos utilizando la técnica de cultivo "in vitro". Guía de Trabajos Prácticos de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UNER
- CAÑAL, M. J., RODRÍGUEZ, R., FERNÁNDEZ, B., SÁNCHEZ-TAMES, R. & MAJADA, J.P. (2001). Fisiología del cultivo in vitro. (pp.3-9).
- CARVAJAL CARVAJAL, C. (2018). Especies Reactivas del Oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medicina Legal De Costa Rica* Vol. 36 (1)
- FERRER MA, PEDREÑO MA, MUÑOZ R, ROS BARCELÓ A. 1990. Oxidation of coniferyl alcohol by cell wall peroxidases at the expense of indole-3-acetic acid and O₂. *Febs Letter* 276: 127-130.
- FOIDL, N., MAKKAR, H. & BECKER, K. (2001). The Potential of *Moringa Oleifera*. *Dar Es Salaam*, 20.
- FRANKLIN, A. (2003). Callogénesis y Establecimiento de suspensiones celulares en el árbol del NIM (*Azadirachta Indica* , A . JUSS).
- GARCÍA SÁNCHEZ, M. (2011). Estrés oxidativo y otras respuestas fisiológicas inducidas por alpeorujos transformados por hongos saprobios en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Editorial de la Universidad de Granada.
- HANAN ALIPI, A.M., MONDRAGÓN PICHARDO, J. & VIBRANS, H. (2009). Solanaceae, *Capsicum annum* L. Última consulta: 12 de febrero de 2020, <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/capsicum-annuum/fichas/ficha.htm#9>.
- HOSSAIN, M., NAKANO, Y. & ASADA, K. (1984). Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide. *Plant Cell Physiol.* 25 (3): 385-395.
- LALLANA, V.H. Y LALLANA MA. DEL C. (2003) Manual de prácticas de fisiología vegetal - INDUCCIÓN DE CALLOS, UTILIZANDO LA TÉCNICA DE CULTIVO "IN VITRO" (pp. 81-84).
- LÓPEZ DO CAMPO, J. (2019). Estudio de la inducción de resistencia en suspensiones celulares de pimiento (*Capsicum annum* L. var. *annuum*) mediante la elicitación con extractos de hoja de *Moringa oleifera*. Trabajo Fin de Master. UDC.
- MACHADO ASSEFH, C. R., COLLAVINO, N. G., DAZ, M., POCOVI, M. I., & MARIOTTI, J. (2013). La actividad peroxidasa en caña de azúcar (*Saccharum* spp): evolución temporal de la reacción y su posible rol en la resistencia a la roya marrón (*Puccinia melanocephala*). *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 39(2), (pp. 169-175).
- MARCOS PÉREZ, D. (2013). Caracterización molecular y análisis de diversidad genética en variedades de pimiento autóctonas de Galicia . Universidad de A Coruña.
- MILLER, G., SUZUKI, N., RIZHSKY, L., HEGIE, A., KOUSSEVITZKY, S. & MITTLER, R. (2007). Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiology* 144(pp.1777-1785)
- MROGINSKI, L. A. & ROCA, W. M. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT: Centro de Investigaciones de Agricultura Tropical. 2(pp. 20-40).
- OLSON, M. E. & FAHEY, J.W. (2011). *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4), (pp. 1071-1082).
- RAZIS-ABDULL, F. A., DIN-IBRAHIM, M., & BRINDHA-KNTAYYA, S. (2014). Health Benefits of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(20), (pp. 8571-8576).

- RODRÍGUEZ, Y. & DEPESTRE, T. (2007). Obtención de líneas de pimiento (*Capsicum annuum*) progenitoras de híbridos F1 , resistentes a enfermedades virales , a partir del estudio de cuatro sub-poblaciones. 34(3), 237–242.
- SALLERES, B. (2005). Estudio de la actividad peroxidasa en líneas celulares de *C. chinense* Jack.y respuesta frente a *Verticillium dahliae* Kleb. Tesis de Licenciatura UDC.
- TOGNOLLI, M., PENEL, C., GREPPIN, H., & SIMON, P. (2002). Analysis and expression of the Class III peroxidase large family in *Arabidopsis thaliana*. Vol. 288,(pp. 129-138).
- TOMÉ CORREDOIRAS, L. (2019). Estudio de la actividad peroxidasa en el medio extracelular de suspensiones elicidadas con un extracto de hojas de *Moringa oleifera*. Universidade de A Coruña.
- TORRES-CASTILLO, J. A., SINAGAWA-GARCÍA, S., MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C. G., & LÓPEZ-FLORES, A. B. (2013). *Moringa oleifera*: phytochemical detection, antioxidants, enzymes and antifungal properties. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 9457, (pp.193–202).
- UGARTE, FP., LIMA, K., MORENO, A. & BERNAL, A. (2018). Estudios preliminares del efecto fortificante de extractos de *Moringa oleifera* Lam. en vitroplantas del clon Williams en aclimatación. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(2), 47-55. Recuperado de <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/index>