

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Estudio do potencial de dous extractos vexetais para o control de dous patóxenos de pemento e o seu efecto sobre o crecemento da planta

Estudio del potencial de dos extractos vegetales para el control de dos patógenos de pimiento y su efecto en el crecimiento de la planta

Study of the potential of two plant extracts for the control of two pepper pathogens and the effect on plant growth



María Fraga Meizoso

Xullo 2020

**Directores Académicos:
José Díaz Varela
Javier Veloso Freire**



D. JOSÉ DÍAZ VARELA, CATEDRÁTICO DE FISIOLOXÍA VEXETAL E D. JAVIER VELOSO FREIRE, CONTRATADO POSDOUTORAL XUNTA, DO DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA DA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que o presente Traballo de Fin de Grado presentado pola alumna MARIA FRAGA MEIZOSO e titulado

“Estudio do potencial de dous extractos vexetais para o control de dous patóxenos de pemento e o seu efecto sobre o crecemento da planta”

“Estudio del potencial de dos extractos vegetales para el control de dos patógenos de pimienta y su efecto en el crecimiento de la planta”

“Study of the potential of two plant extracts for the control of two pepper pathogens and the effect on plant growth”

foi realizado baixo a súa dirección e autorizan a súa presentación para que poida ser xulgado polo tribunal correspondente.

E para que así conste, expiden e asinan o presente informe en A Coruña, a 22 de Xullo de 2020.

Asdo. José Díaz Varela

Asdo. Javier Veloso Freire

ÍNDICE

RESUMO

RESUMEN

SUMMARY

1. Introducción	1
1.1. Pemento (<i>Capsicum annuum</i> cv. Padrón)	1
1.2. <i>Botrytis cinerea</i>	2
1.3. <i>Phytophthora capsici</i>	4
1.4. Defensa da planta.....	5
1.5. Extractos vexetais	7
2. Obxectivos.....	9
3. Material e métodos	9
3.1. Material vexetal	9
3.2. Material fúnxico	10
3.3. Elaboración dos extractos	10
3.4. Ensaio <i>in vitro</i>	10
3.5. Ensaio de indución de resistencia en planta.....	11
3.6. Ensaio de efecto no crecemento da planta	13
3.7. Análise estatística	14
4. Resultados.....	15
4.1. Ensaio de actividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	15
4.2. Ensaio de indución de resistencia fronte a <i>Phytophthora capsici</i> polo tratamento da planta cos extractos.....	17
4.3. Ensaio do efecto da aplicación do extracto de <i>Urtica dioica</i> no crecemento das plantas de pemento.	17
5. Discusión	18
6. Conclusións	20
Conclusiones.....	20
Conclusions	20
7. Bibliografía.....	20

RESUMO

O pemento de Padrón (*Capsicum annuum* cv. Padrón) é unha planta de gran importancia económica en Galicia, aínda que posúe unha alta susceptibilidade a diversas enfermidades que producen grandes perdas no seu cultivo. Algúns dos patóxenos que atacan a este cultivo son o oomicete (pseudofungo) *Phytophthora capsici* e o fungo *Botrytis cinerea*. No presente traballo estudamos se os extractos vexetais de *Ginkgo biloba* e *Urtica dioica* teñen efecto antimicrobiano sobre estes patóxenos, e os resultados indican que non é así. Ademais, estudouse se os extractos eran eficaces fronte a *Phytophthora capsici* nun ensaio en planta e se o extracto de ortiga causaba un efecto sobre o crecemento da planta. Os resultados obtidos suxiren que ambos extractos poden ter efectos sobre a indución da resistencia, mais non presentan actividade funxicida *in vitro*.

RESUMEN

El pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* cv. Padrón) es una planta de gran importancia económica en Galicia, aunque posee una alta susceptibilidad a diversas enfermedades que producen grandes pérdidas en su cultivo. Algunos de los patógenos que atacan a este cultivo son el oomiceto (pseudohongo) *Phytophthora capsici* y el hongo *Botrytis cinerea*. En el presente trabajo estudiamos si los extractos vegetales de *Ginkgo biloba* y *Urtica dioica* tienen efecto antimicrobiano sobre estos patógenos, y los resultados indican que no es así. Además, se estudió si los extractos eran eficaces frente a *Phytophthora capsici* en un ensayo en planta y si el extracto de ortiga causaba un efecto sobre el crecimiento de la planta. Los resultados obtenidos sugieren que ambos extractos pueden tener efectos sobre la inducción de la resistencia, pero no presentan actividad fungicida *in vitro*.

SUMMARY

Padrón pepper (*Capsicum annuum* cv. Padrón) is a plant of great economic importance in Galicia, despite it has a high susceptibility to various diseases that cause large losses in this crop. Some of the pathogens that attack this crop are the oomycete (fungal-like organism) *Phytophthora capsici* and the fungus *Botrytis cinerea*. In the present work we studied if the plant extracts of *Ginkgo biloba* and *Urtica dioica* have an antimicrobial effect on these pathogens, and the results indicate that this is not the case. In addition, it was studied whether the extracts were effective against *Phytophthora capsici* in a plant

assay and whether nettle extract caused an effect on plant growth. The results obtained suggest that both extracts may have effects on induced resistance, but they do not present antifungal activity *in vitro*.

1. Introducción

1.1. Pemento (*Capsicum annuum* cv. Padrón)

O pemento (xénero *Capsicum*), forma parte da familia Solanaceae, á cal pertencen outras plantas de gran importancia económica como a pataca ou o tomate. A súa orixe ten lugar no Novo Mundo, incluíndo a área tropical do norte de Sudamérica, América Central e as illas da rexión (Govindarajan & Salzer, 1985).

As cinco especies principais son *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum baccatum* L. e *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav., sendo a especie máis amplamente cultivada *C. annuum*. Esta especie é perenne, herbácea ou sufrutescente, de vida curta (cultivada como anual), con follas oblongas e glabras, flores solitarias de cor branca e bagas verdes que maduran en amarelo, laranxa ou vermello, colgantes, extremadamente variables en tamaño, forma e picante (De, 2003).

En Galicia, os cultivos hortícolas supoñen actualmente arredor do 3,97% da superficie dedicada aos cultivos herbáceos, destacando polo seu volume de produción os cultivos de tomate, feixón verde, pemento e leituga, entre outros. O pemento ocupa unha superficie de 1.119 ha, obténdose unha produción de 64.881 tm, das cales o 55% se comercializa, sendo as provincias de A Coruña e Pontevedra as principais produtoras (Xunta de Galicia, 2019). A distribución por variedades atópase claramente diferenciada, xa que arredor do 70% da superficie cultivada é pemento de variedades autóctonas, mentres que o resto son variedades híbridas (Taboada Arias *et al.*, 2003).

As variedades locais galegas inclúen varios ecotipos con características organolépticas que as fan moi apreciadas polos consumidores. As principais variedades son cinco: dúas delas de froito curto (Padrón e Couto) e tres de froito mediano ou longo (Arnoia, Blanco Rosal e Oimbra) (Táboa 1) (Pochard, 1966; Poves *et al.*, 2004).

Táboa 1. Clasificación dos principais pementos autóctonos que se producen e comercializan en Galicia. Modificado de: Poves *et al.* (2004).

Tipo	Sección lonxitudinal froito	Peso froito	Forma froito	Capsaicina	Clase	Grupo
Padrón	Triangular	-	Curto	Presente	C4	9
Couto	Triangular	-	Curto	Ausente	C4	9
Arnoia	Rectangular	< 100 g	-	-	B3-B4	6
Branco Rosal	Triangular	-	Longo	Ausente	C1	7
Oimbra	Triangular	-	Longo	Ausente	C1	7

O pemento de Padrón (*Capsicum annuum* cv. Padrón) é un ecotipo local cuxa orixe provén de sementes traídas a Galicia polos monxes franciscanos á casa de Misións de Herbón, unha localidade veciña de Padrón (A Coruña), no século XVII. O seu froito é semicartilaxinoso, de cor verde en estado inmaduro e vermello en estado maduro, colgante, con talla e forma variable dependendo do grao de desenvolvemento e das condicións de cultivo (Fig. 1) (Estrada *et al.*, 2000; Poves *et al.*, 2004).



Fig. 1. Froito inmaduro (tamaño comercial) do Ecotipo Padrón.

A súa aclimatación ao solo e clima galegos foi rápida, de maneira que o seu cultivo se estendeu desde o século XVIII ata a actualidade, considerándose habitual na dieta desde entón, cultivándose en diferentes comarcas e comercializándose a outros países como Portugal ou Alemaña (Estrada *et al.*, 2000; Poves *et al.*, 2004).

Unha restrición importante na produción desta planta é a alta susceptibilidade que presenta a unha serie de enfermidades causadas por diversos patóxenos de tipo bacteriano, fúnxico ou vírico, que poden provocar grandes perdas económicas. Entre os patóxenos que atacan a este cultivo pódense destacar o pseudofungo (oomicete) *Phytophthora capsici* Leon., que causa a tristeza do pemento, e o fungo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., especie modelo de necrotrofo que presenta un amplo rango de hóspedes (Govindarajan & Salzer, 1985). Debido á importancia destes patóxenos, centraremos o estudo neles.

1.2. *Botrytis cinerea*

O fungo *Botrytis cinerea*, coñecido como mofo gris, é un fungo necrotrofo que pode infectar a máis de 200 especies vexetais, principalmente dicotiledóneas, aínda que algunhas monocotiledóneas tamén son susceptibles. É máis destrutivo en tecidos maduros ou senescentes, pero xeralmente entra nos tecidos nunha etapa máis temperá no desenvolvemento do cultivo, permanecendo inactivo durante un período considerable,

actuando como endófito, antes de podreecer rapidamente os tecidos cando o ambiente é propicio e a fisioloxía do hóspede cambia (Dean *et al.*, 2012; Fillinger & Elad, 2016; Williamson *et al.*, 2007).

Pode causar pudrición das partes aéreas da planta e podremia de hortalizas, froitas e flores, producindo conidióforos grises e macroconidios típicos da enfermidade e causando danos graves despois da colleita de cultivos aparentemente sans, coas consecuentes perdas económicas (Dean *et al.*, 2012; Droby & Lichter, 2007; Williamson *et al.*, 2007).

O proceso de infección de *Botrytis cinerea* xeralmente consta das seguintes etapas: penetración da superficie do hóspede, morte dos tecidos do hóspede/formación de lesión primaria, expansión da lesión/maceración de tecidos e esporulación (Choquer *et al.*, 2007; van Kan, 2006).

Os conidios deste patóxeno considéranse a principal fonte de inóculo e a súa xerminación e adhesión ás superficies das plantas son fases cruciais que preceden á penetración e colonización do hóspede. O fungo detecta e reconece as características da superficie do hóspede, secreta unha matriz extracelular que serve de unión a través de interaccións hidrofóbicas e libera varias enzimas extracelulares que facilitan a súa penetración ao romper as barreiras físicas da planta (Choquer *et al.*, 2007; Doss, 1999).

A morte celular da planta ocorre a través de toxinas fúnxicas e un estalido oxidativo xerado tanto polo patóxeno como polo hóspede. *Botrytis cinerea* secreta fitotoxinas inespecíficas para matar células dun gran número de plantas, entre as que destaca o sesquiterpeno botridial, producido durante a infección da planta e que induce clorose e colapso celular, facilitando así a penetración e a colonización (Colmenares *et al.*, 2002). Ademais das toxinas, produce especies reactivas de osíxeno (ROS) durante a infección, acumulándose peróxido de hidróxeno (H₂O₂) nos tecidos. A morte celular tamén se produce debido a un estalido oxidativo producido polo propio hóspede, como reacción ao ataque do fungo. Esta rápida produción de ROS pola planta é necesaria para a expresión de xenes defensivos e a resposta hipersensible (HR), un tipo de morte celular programada que limita o acceso do patóxeno á auga e aos nutrientes. Sen embargo, nalgúñas interaccións planta-patóxeno, a morte celular programada ten un papel claro na promoción do crecemento do patóxeno (Choquer *et al.*, 2007; Greenberg & Yao, 2004).

A pesar de que existen funxicidas para o seu control, moitos deles non funcionan debido á plasticidade xenética do fungo. *Botrytis cinerea* é un patóxeno difícil de controlar porque ten unha gran variedade de modos de ataque, diversos hóspedes como

fontes de inóculo e pode sobrevivir como micelio ou conidios ou durante períodos prolongados de tempo como esclerocios en restos de cultivos (Droby & Lichter, 2007; Williamson *et al.*, 2007).

1.3. *Phytophthora capsici*

Phytophthora capsici é un oomicete (pseudofungo) pátoxeno moi dinámico e destrutivo que produce a enfermidade coñecida como tristeza do pemento nun amplo rango de hóspedes vexetais, atacando a todas as cucurbitáceas, algunhas solanáceas (pemento, tomate, berenxena) e feixón (Lamour *et al.*, 2012).

Os síntomas varían considerablemente segundo o hóspede, a parte da planta infectada e as condicións ambientais. En áreas secas a infección prodúcese xeralmente nas raíces e a coroa e as plantas infectadas presentan unha distintiva lesión negra/marrón na liña do solo, mentres que en áreas húmidas, a infección aparece en todas as partes da planta. As infeccións radiculares causan “damping off” nas plántulas e, en plantas máis vellas, é común observar retraso no crecemento, murcha e, finalmente, morte (Barchenger *et al.*, 2018; Erwin & Ribeiro, 1996; Hausbeck & Lamour, 2004).

Phytophthora capsici é unha especie heterotálica con illados que posúen un dos dous tipos de apareamento (designados A1 e A2), os cales requiren proximidade para que se produza dito apareamento (Ko, 1988). As oosporas formadas poden persistir no solo durante anos e son resistentes ás duras condicións ambientais (Bowers *et al.*, 1990). Unha vez xerminan, producen tubos xerminais que se ramifican nun micelio típico e/ou producen esporanxios, os cales son diseminados polo vento e a auga (Barchenger *et al.*, 2018; Lamour *et al.*, 2012).

Durante eventos de choiva ou rego, os esporanxios maduros despréndense facilmente e, cando se somerxen na auga, poden liberar rapidamente 20-40 zoosporas móbiles biflaxeladas. As zoosporas son negativamente xeotrópicas e nadan quimiotácticamente cara as plantas, onde se adhíren á superficie das mesmas e producen un tubo xerminal, que axudado coas enzimas secretadas polo patóxeno, penetra e coloniza os tecidos do hóspede (Hausbeck & Lamour, 2004; Lamour *et al.*, 2012).

De acordo coa súa designación como hemibiotrofo, a infección por *Phytophthora capsici* presenta dúas etapas distintas: ao comezo da infección, as células non parecen estar afectadas (biotrofia), indicando a supresión local das respostas de defensa, mentres que, cando a infección avanza, mata as células infectadas e causa colapso tisular e necrose

(necrotrofia). O colapso do tecido é seguido da emerxencia de novos esporanxios, proporcionando medios para a dispersión e un novo ciclo de infección (Lamour *et al.*, 2012)

A incidencia e gravidade da enfermidade aumentaron significativamente nas últimas décadas polo que, debido ao seu impacto na perda de cultivos, a ausencia de cultivares resistentes, a alta diversidade xenotípica e a recombinación sexual do patóxeno, aumentou tamén o número de ferramentas e recursos para estudalo (Barchenger *et al.*, 2018; Lamour *et al.*, 2012).

1.4. Defensa da planta

As plantas son hóspedes potenciais para diversos grupos de patóxenos, incluíndo fungos, oomicetes, virus, bacterias e nematodos, e a súa natureza sésil fai que a exposición a ditos organismos sexa inevitable. Sen embargo, as plantas son capaces de preparar unha defensa contra esta infección, non só localmente, se non tamén sistémicamente (Fu & Dong, 2013; Jones & Dangl, 2006; Pieterse *et al.*, 2012).

As células vexetais están xeralmente protexidas por diversas capas de barreiras físicas, incluíndo a cutícula na superficie foliar, a parede celular e a membrana plasmática, que impiden o acceso da maioría de microorganismos. Ademais, poden producir unha gran variedade de químicos para loitar contra os patóxenos como, por exemplo, as saponinas, que aparecen na superficie de moitas plantas e cuxas propiedades similares ao xabón poden alterar as membranas dos fungos (Fu & Dong, 2013; Glazebrook, 2005; Jones & Dangl, 2006).

A parte destes mecanismos de defensa non específicos, diferentes clases de patóxenos poden ser recoñecidos por receptores de recoñecemento de patróns (PRRs), localizados na superficie das células, que se unen a patróns moleculares asociados a patóxenos (PAMPs) (Fu & Dong, 2013; Ingle *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Pieterse *et al.*, 2012).

Os PAMPs son moléculas altamente conservadas e amplamente distribuídas entre especies microbianas (sexan patóxenas ou non), onde desempeñan unha función esencial, pero están ausentes no hóspede. Algúns PAMPs que cumpren estes criterios e provocan unha resposta de defensa nas plantas inclúen a quitina, os β -glucanos e o ergosterol de fungos (Ingle *et al.*, 2006; Nürnberger *et al.*, 2004).

A detección de PAMPs é unha importante compoñente da resistencia en plantas e serve como un sistema de alerta temperá da presenza de patóxenos potenciais. A unión dun PAMP ao receptor de patróns apropiado conduce á transdución de sinais e á activación dunha serie de mecanismos basais, incluíndo a produción de etileno, o estalido oxidativo, a deposición de calosa, a indución da expresión de xenes relacionados coa defensa e, nalgúns casos, morte celular localizada denominada resposta hipersensible (HR), que restrinxe a propagación do patóxeno (Freeman & Beattie, 2008; Ingle *et al.*, 2006).

Actualmente, o desenvolvemento evolutivo do sistema inmune da planta represéntase como un modelo en zig-zag (Fig. 2). Os PAMPs son recoñecidos por receptores de recoñecemento de patróns (PRRs). Isto resulta na activación da inmunidade activada por PAMPs (PTI). Por outra banda, os patóxenos exitosos adquiriron a capacidade de producir moléculas efectoras para romper esta primeira liña de defensa, xa sexa evitando a detección dos seus PAMPs ou suprimindo a sinalización da PTI. Como consecuencia, as plantas adquiriron unha segunda liña de defensa na que proteínas de resistencia (R) median o recoñecemento deses efectores específicos do atacante, o que resulta na inmunidade activada por efectores (ETI) (Boller & Felix, 2009; Jones & Dangl, 2006; Pieterse *et al.*, 2012).

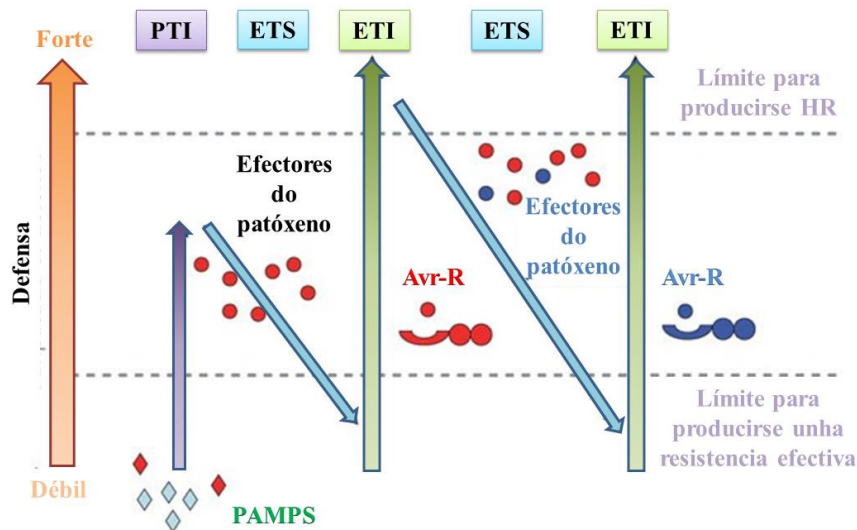


Fig. 2. Modelo en zigzag que ilustra as diferentes respostas inmunes da planta e os principais compoñentes que interveñen nelas. Modificado de: Jones & Dangl (2006).

Despois de desencadearse a PTI ou a ETI, diversas hormonas vexetais activan unha rede de sinalización na planta inmune, sendo o ácido salicílico e os xasmonatos as principais hormonas que regulan esta defensa (Bari & Jones, 2009; Browse, 2009; Katagiri & Tsuda, 2010; Vlot *et al.*, 2009). Sen embargo, outras sustancias coma o óxido

nítrico e as hormonas etileno, ácido abscísico, xiberelinas, auxinas, citoquininas e brasinoesteroides, funcionan como moduladores da rede de sinalización da planta inmune (Kazan & Manners, 2009; Moreau *et al.*, 2010; Nakashita *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2008; Ton *et al.*, 2009; van Loon *et al.*, 2006; Walters & McRoberts, 2006).

Os cambios na concentración das sustancias mencionadas anteriormente ou na sensibilidade desencadeada durante as interaccións cos patóxenos median toda unha gama de respostas adaptativas nas plantas, a miúdo a costa do crecemento e desenvolvemento. A composición e momento da mestura hormonal producida pode determinar se os tecidos vexetais son máis susceptibles ou resistentes aos patóxenos. As interaccións antagónicas e sinérxicas entre diversas rutas de transdución de sinais hormonais proporcionan á planta unha poderosa capacidade de regular a súa resposta inmune segundo o invasor atopado e utilizar os recursos dunha maneira rendible (Bari & Jones, 2009; Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2012).

A activación do sistema inmune en resposta aos patóxenos produce a síntese *de novo* de compostos que reducen ou iniben o ataque do patóxeno. Sen embargo, a activación do sistema inmune non se limita ao órgano da planta atacado (resposta local) se non que se activan mecanismos de defensa en órganos distantes, aínda sen afectar (resposta sistémica). As respostas locais (no órgano en contacto directo co patóxeno), producen unha sinal que se propaga ao longo da planta e induce cambios na expresión xénica en partes da planta que permanecen sen infectar (órgano sistémico sen ningunha infección). A activación de defensas de maneira sistémica permitirá reducir a expansión do patóxeno pola planta (Heil & Bostock, 2002; Van Loon, 1997).

Hai varios mecanismos de resistencia sistémica entre os que destacan a resistencia sistémica adquirida (SAR) e a resistencia sistémica inducida (ISR). A SAR actívase trala infección das plantas por patóxenos que producen necrose e está acompañada dun incremento de ácido salicílico (Feys & Parker, 2000; Fu & Dong, 2013; Ryals *et al.*, 1996). A ISR actívase trala colonización das raíces por determinadas cepas bacterianas ou fúnxicas non patóxenas da rizosfera e depende do etileno e os xasmonatos (Heil & Bostock, 2002; Pieterse & Van Loon, 2004; Van Loon, 1997).

1.5. Extractos vexetais

A investigación para reducir a aplicación de funxicidas na agricultura a través do descubrimento de novos antimicrobianos naturais é necesaria para responder ás

necesidades da agricultura sostible (da Rocha & Hammerschmidt, 2005; Walters *et al.*, 2013).

Ginkgo biloba L. é unha das especies máis importantes de plantas medicinais. É unha valiosa fonte de varios grupos de produtos naturais como lípidos fenólicos, terpenoides (ginkgólidos e bilobalida) e flavonoides (glucósidos flavonoides) (Begum *et al.*, 2002; Briskin, 2000; Jaggy & Koch, 1997; Żarnowska *et al.*, 2000).

Traballos anteriores sobre os lípidos fenólicos de *Ginkgo biloba* revelaron que contén ácidos anacárdicos, cardanoles e cardoles con cadeas laterais de alquenos que difiren na lonxitude da cadea e nos patróns de insaturacións (Irie *et al.*, 1996). En particular, os ácidos anacárdicos inhiben enzimas como a tirosinasa e a liposixenasa (Kubo *et al.*, 1994; Shobha *et al.*, 1994) e presentan actividade antimicrobiana (Himejima & Kubo, 1991).

Durante o estudo dos metabolitos secundarios activos fisioloxicamente contra as zoosporas do oomicete (pseudofungo) *Aphanomyces cochlioides* Drechsler, os compoñentes solubles de acetato de etilo (EtOAc) dos froitos inmaduros de *Ginkgo biloba* amosaron inhibición da motilidade, seguida da lise de zoosporas de dito patóxeno. A presenza dun grupo carboxilo libre e dunha cadea lateral alifática parece importante para a actividade lítica dos ácidos anacárdicos (Begum *et al.*, 2002).

Urtica dioica L. é unha planta amplamente utilizada na medicina tradicional e diversos estudos fitoquímicos demostraron que os seus principais constituíntes químicos son os flavonoides, taninos, ácidos graxos, polisacáridos, isolectinas, esteroides, terpenos, proteínas, vitaminas e minerais (Gül *et al.*, 2012; Joshi *et al.*, 2014).

Os compostos que presenta a planta son β -sitosterol, ácido trans-ferúlico, dotriacotano, ácido erúxico, ácido ursólico, escopoletina, rutina, quercetina e alcohol p-hidroxibencílico (Ji *et al.*, 2007; Joshi *et al.*, 2014).

Os extractos de *Urtica dioica* son moi utilizados polos agricultores. Traballos anteriores sobre os efectos antimicrobianos e antioxidantes dos extractos desta planta revelaron que posúen propiedades antimicrobianas, xa que reducen os mofos grises e azuis (Gülçin *et al.*, 2004; Romanazzi *et al.*, 2013).

2. Obxectivos

1- Averiguar se os extractos de *Ginkgo biloba* e *Urtica dioica* teñen actividade funxicida *in vitro* fronte a *Botrytis cinerea* e *Phytophthora capsici*.

2- Ensañar a eficacia dos extractos de *Ginkgo biloba* e *Urtica dioica* para protexer as plantas de pemento (*Capsicum annuum* L. cv. Padrón) fronte ao patóxeno *Phytophthora capsici*.

3- Comprobar se o extracto de *Urtica dioica* ten efecto no crecemento da planta.

3. Material e métodos

3.1. Material vexetal

Para realizar o ensaio en planta con *Phytophthora capsici*, utilizáronse plántulas de pemento de Padrón (*Capsicum annuum* L. cv. Padrón), obtidas a partir de sementes plantadas nun medio con vermiculita. As plantas cultiváronse durante 14 días, tras os cales se seleccionaron as plantas máis vigorosas para transplantalas a un sustrato composto de terra e perlita (proporción 2:1).



Fig. 3. Plántulas de pemento de Padrón en sustrato composto de terra e perlita.

Para realizar o ensaio en planta con *Urtica dioica* e comprobar o efecto deste tratamento sobre o crecemento das plantas, utilizáronse plántulas de pemento de Padrón (*Capsicum annuum* L. cv. Padrón) mercadas en Severiano Agrocomercial (As Pontes de Gracia Rodríguez) e transplantadas á mesma terra, obtida na horta do domicilio da autora deste Traballo Fin de Grado, para que todas tiveran as mesmas condicións.

3.2. Material fúnxico

Para realizar os ensaios en placa utilizáronse dous patóxenos: a cepa B0510 do fungo *Botrytis cinerea* e a cepa PC450 do pseudofungo *Phytophthora capsici*. Ambos patóxenos incubáronse en medio PDA (Potato Dextrose Agar) nunha cámara a 23°C, antes de ser utilizados.

Para os ensaios de inoculación en planta só se utilizou a cepa PC450 de *Phytophthora capsici*, incubándoa en medio PDA nunha cámara a 23°C. Posteriormente, realizouse un repicado dese cultivo en Agar V8, incubándoo a 23°C durante 4 días, para obter zoosporas.

3.3. Elaboración dos extractos

Para realizar os ensaios en placa e o ensaio en planta con *Phytophthora capsici*, obtivéronse follas de *Ginkgo biloba* e *Urtica dioica*, as cales se lavaron, secaron a 60°C e trituraron nun tubo e cun axitador con axuda dunha espátula de laboratorio. Ambos extractos preparáronse engadindo 250 mg de follas secas a 2,5 ml de etanol ao 80%, incubando posteriormente a mestura nun bloque térmico a 50°C durante 15 minutos. Despois deste tempo, deixáronse arrefriar as suspensións a temperatura ambiente e, unha vez frías, filtráronse con papel de laboratorio.

Para realizar o ensaio en planta con *Urtica dioica* e comprobar o efecto deste tratamento sobre o crecemento das plantas, recolectáronse follas de ortiga, as cales se lavaron, secaron a aproximadamente 50°C e trituraron con axuda dun rodillo. Na preparación do extracto utilizáronse 10 g dese po de ortiga e 100 g de auga fervida e, despois de 30 minutos, filtrouse o fluído, enrasando a 100 g.

3.4. Ensaio *in vitro*

Para os ensaios en placa leváronse a cabo dous experimentos independentes para cada fungo, con catro réplicas de cada tratamento e cada experimento. Unha vez obtidos os extractos de *Ginkgo biloba* e *Urtica dioica*, preparouse medio PDA con distintas concentracións de ditos extractos vexetais (1:1, 1:2 e 1:4), ademais dun control con etanol

ao 80% na mesma proporción que nas placas con extracto (en todos os casos: a proporción final etanol-auga foi 1:1250).

Para iniciar o cultivo nas placas con extractos, perforáronse os cultivos de *Botrytis cinerea* e *Phytophthora capsici* preparados anteriormente cun sacabocados de 9 mm de diámetro, obtendo así fragmentos circulares que serviron como inóculo. Estes fragmentos colocáronse no centro de cada unha das placas dos distintos tratamentos, selándose con Parafilm as correspondentes a *Phytophthora capsici* e pechándose con cinta adhesiva, para permitir a aireación, as correspondentes a *Botrytis cinerea* (Fig. 4).

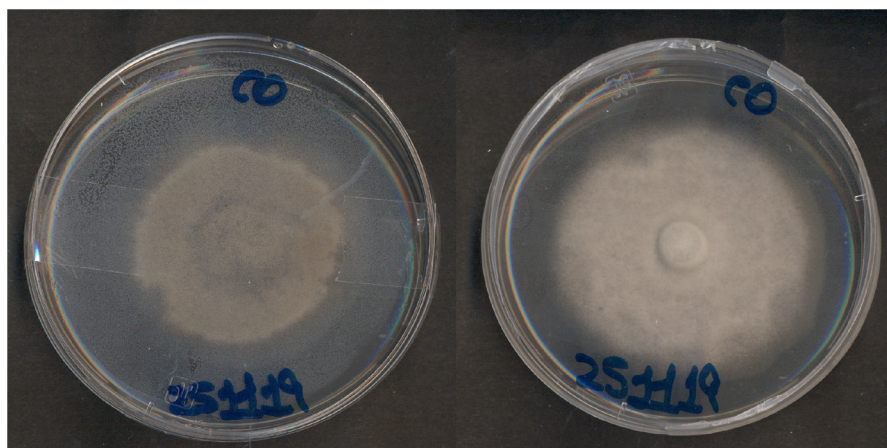


Fig. 4. Ensaio en placa con *Botrytis cinerea* (esq.) e *Phytophthora capsici* (der.).

As placas mantivéronse en condicións de escuridade a 23°C. Unha vez transcorridas 24 horas, tomáronse dúas medidas do diámetro do micelio de cada placa con axuda dun calibre e continuáronse tomando medidas durante 72 horas, a intervalos de 24 horas.

3.5. Ensaio de indución de resistencia en planta

En primeiro lugar, levouse a cabo un ensaio en planta con *Phytophthora capsici*, no que se utilizaron plántulas de pemento de Padrón (*Capsicum annuum* L. cv. Padrón), obtidas a partir de sementes, como se indica no apartado 3.1. Aproximadamente 10 días despois de transplantar as plantas, procedeuse ao tratamento das mesmas, dividíndoas en seis grupos, de doce plantas cada un: control, control inoculado, *Ginkgo*, *Ginkgo* inoculado, *Urtica* e *Urtica* inoculado. A composición dos tratamentos foi a seguinte:

Táboa 2. Composición dos tratamentos para o primeiro ensaio en planta.

	Control	Tratamento <i>Ginkgo</i>	Tratamento <i>Urtica</i>
Etanol 80%	0,1 ml	-	-
Extracto <i>Ginkgo</i>	-	0,1 ml	-
Extracto <i>Urtica</i>	-	-	0,1 ml
Auga mineral	100 ml	100 ml	100 ml

Para realizar os distintos tratamentos, tomáronse 5-10 ml de cada preparación e pulverizáronse as plantas “till run-off”, é dicir, ata que as follas quedan ben impregnadas coa solución correspondente e esvaran gotas.

24 horas despois do tratamento, fíxose a inoculación con *Phytophthora capsici*. Para isto, obtivéronse previamente zoosporas do pseudofungo a partir dos cultivos en Agar V8 que se indican no apartado 3.2. Estes cultivos cortáronse en anacos de máis ou menos 1 cm², e engadiuse o micelio da metade de cada placa a un matraz erlenmeyer con KNO₃ 0,01 M (25 ml por erlenmeyer), esterilizado no autoclave, e deixáronse en axitación suave (100 rpm) a temperatura e luz ambientais durante 4 días (Fig. 5).

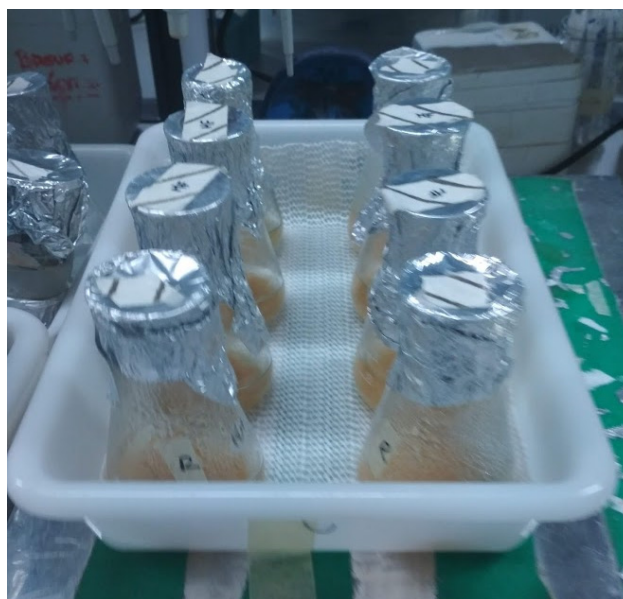


Fig. 5. Proceso de obtención de zoosporas de *Phytophthora capsici*.

Pasado este tempo, puxéronse os erlenmeyer nunha neveira durante 45 minutos e despois a temperatura ambiente durante outros 45 minutos para liberar as zoosporas. A continuación, filtrouse o líquido dos matraces a través dunha gasa previamente esterilizada en autoclave e o eluído recolleuse noutro erlenmeyer autoclavado.

A concentración de zoosporas recontouse nunha cámara Malassez tomando 0,5 ml do fluído nun eppendorf, o cal se axita nun vórtex durante 1 minuto para enquistar as zoosporas e podelas contar facilmente. Unha vez feito o reconto, axustamos a concentración do inóculo a 10^4 zoosporas/ml con auga destilada e engadimos 5 ml do inóculo ao colo de cada planta. As plantas incubáronse en condicións de encharcamento para favorecer a infección, é dicir, engádese auga da billa ás bandexas ata que cubra aproximadamente a metade da altura do substrato.

Os síntomas medíronse diariamente tras a inoculación aínda que cabe destacar que, debido ás circunstancias excepcionais producidas a causa da COVID-19, ditas medicións só se puideron realizar durante 3 días, quedando o experimento incompleto tras o peche do laboratorio para cumprir as normas sanitarias e non podendo realizarse un experimento independente adicional para corroborar os resultados obtidos. Para avaliar a severidade dos síntomas e para o cálculo da AUDPC (área baixo a curva de progreso da enfermidade), (AUPDC) seguiuuse a metodoloxía de García *et al.* (2018).

3.6. Ensaio de efecto no crecemento da planta

Para realizar o ensaio en planta co extracto de *Urtica dioica* e comprobar a influencia deste tratamento sobre o crecemento das plantas de pemento, leváronse a cabo dous experimentos independentes con trinta plantas cada un (10 plantas cada tratamento).

Unha vez transplantados os pementos, como se indica no apartado 3.1., mediuse a súa altura e o número de follas, para ter uns datos iniciais cos que comparar o progreso do experimento, e aplicáronse os distintos tratamentos (Táboa 3):

Táboa 3. Composición dos tratamentos para o segundo ensaio en planta.

	Control	Ortiga en follas	Ortiga en terra
H ₂ O fervida	20 g	10 g	10 g
H ₂ O billa	980 g	980 g	980 g
Extracto <i>Urtica</i>	-	10 g	10 g

En cada planta aplicáronse 50 g do tratamento na terra e 50 g nas follas mediante pulverización (Fig. 6) e tomáronse medidas de altura, número de follas e número de flores, desde o inicio do experimento ata o final, a intervalos de 7 días. Unha vez rematado o ensaio, arrincáronse as plantas, laváronse as raíces e pesáronse para obter datos de peso fresco e seco.



Fig. 6. Plantas pulverizadas con extracto de *Urtica dioica*.

3.7. Análise estatística

As análises estatísticas realizáronse co programa Statgraphics Centurion XVII. Os datos obtidos nos ensaios en placa analizáronse coa proba de Kruskal-Wallis. En canto aos valores obtidos nos ensaios en planta, os datos de severidade e de área baixo a curva de progreso da enfermidade (AUPDC) analizáronse coas probas χ^2 de Pearson e Kruskal-Wallis. No resto dos datos obtidos nos ensaios en planta, utilizouse a proba de Kruskal-Wallis para coñecer qué grupo ou grupos difiren dos demais.

4. Resultados

4.1. Ensaio de actividade antimicrobiana *in vitro*

Ningún dos extractos utilizados semellou a simple vista producir inhibición do crecemento de *Phytophthora capsici* e *Botrytis cinerea* (Fig. 7). Os datos de diámetro de colonia 72 horas tras o comezo do experimento amósanse na Fig 8. Trala realización da proba de Kruskal-Wallis, determinouse que si existían diferenzas significativas entre os distintos tratamentos (p-valor < 0,05), agás no ensaio de *Botrytis cinerea* tratada con *Ginkgo* (Fig. 8B) onde o p-valor foi maior de 0,05. Utilizando o procedemento de Bonferroni, hai 2 comparacións por pares estatisticamente significantes con nivel de confianza do 95% no caso A e 1 nos casos C e D (Fig. 8).

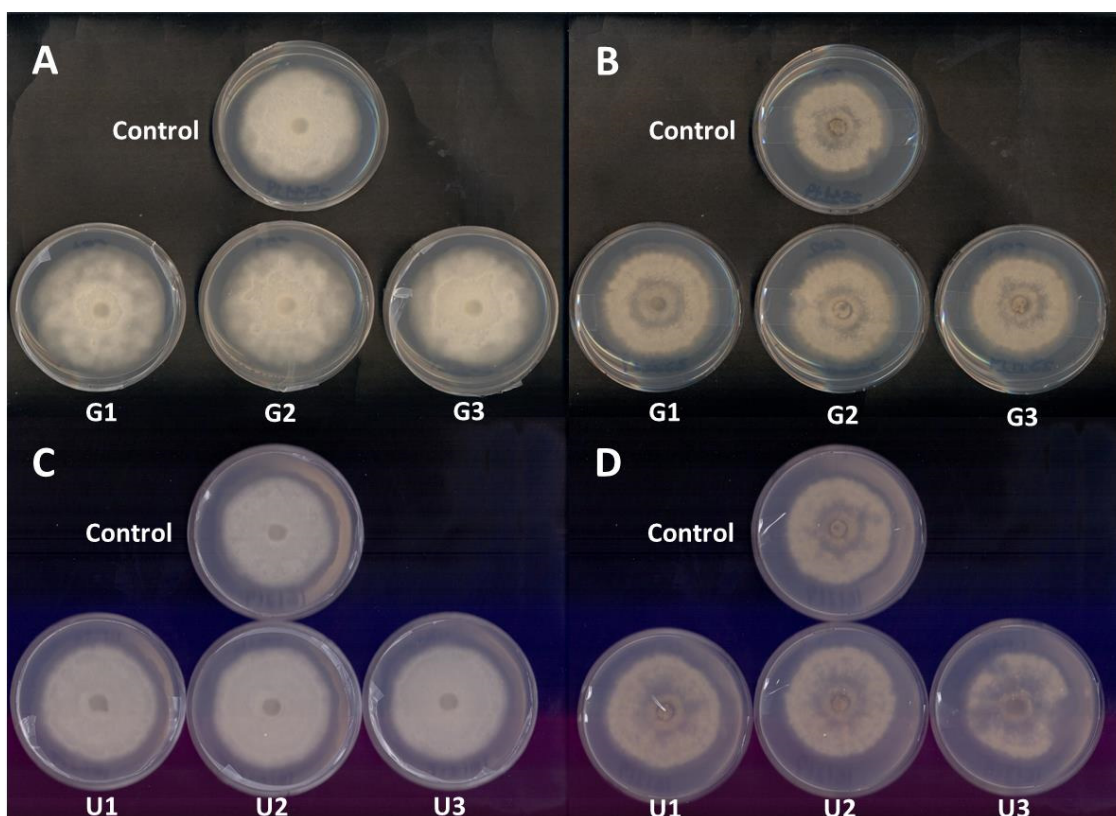


Fig. 7. Crecemento de *Phytophthora capsici* e *Botrytis cinerea* en presenza dos distintos extractos. A: *P. capsici* tratada con *G. biloba*, B: *Botrytis cinerea* tratada con *G. biloba*, C: *P. capsici* tratada con *U. dioica*, D: *Botrytis cinerea* tratada con *U. dioica*. G1, G2 e G3 indican as tres concentracións dos extractos (1:1, 1:2 e 1:4, respectivamente), o mesmo que U1, U2 e U3.

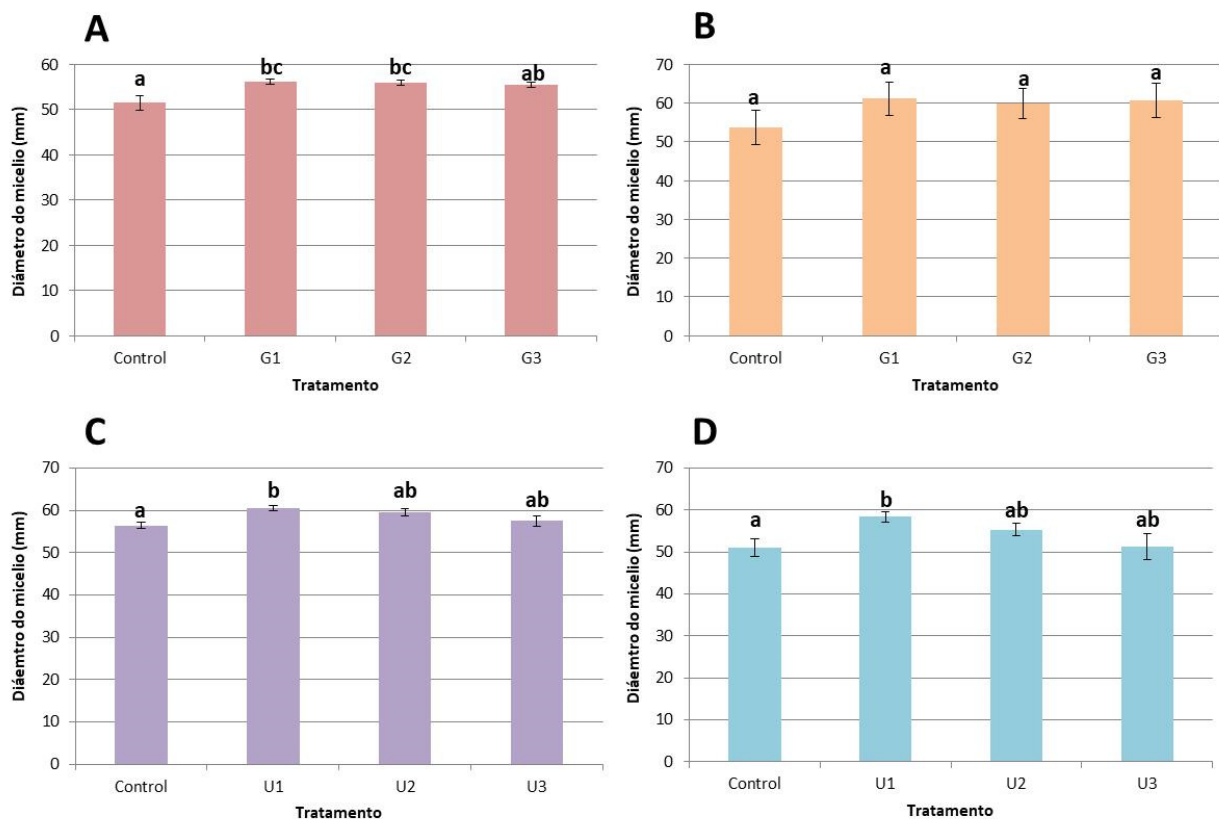


Fig. 8. Efecto dos distintos extractos vexetais sobre o crecemento de *Phytophthora capsici* e *Botrytis cinerea*. A: *P. capsici* tratada con *G. biloba*, B: *B. cinerea* tratada con *G. biloba*, C: *P. capsici* tratada con *Urtica dioica*, D: *Botrytis cinerea* tratada con *Urtica dioica*. G1, G2 e G3 indican as tres concentracións dos extractos (1:1, 1:2 e 1:4, respectivamente), o mesmo que U1, U2 e U3. As letras diferentes indican diferenzas significativas entre tratamentos.

4.2. Ensaio de indución de resistencia fronte a *Phytophthora capsici* polo tratamento da planta cos extractos

Para avaliar os síntomas, calculouse a área baixo a curva de progreso da enfermidade (AUPDC) a partir dos datos dos tres días nos que se puideron determinar os síntomas cunha escala de severidade entre o valor 0 (ningún síntoma) a 7 (planta totalmente morta) (García *et al.*, 2018). O análise dos datos da AUDPC indica que non existen diferenzas estatisticamente significativas entre o tratamento control, o tratamento con *Ginkgo* e o tratamento con *Urtica* (Fig. 9).

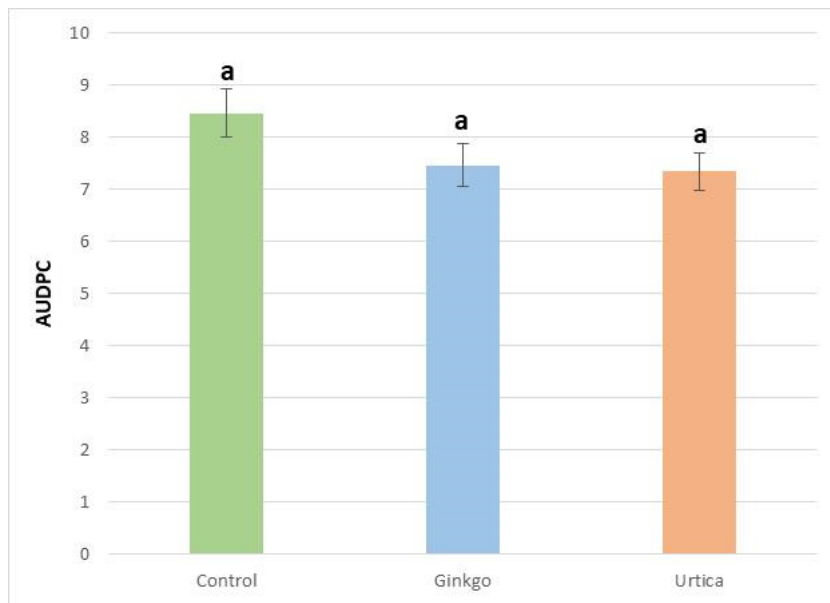


Fig. 9. Efecto dos distintos extractos vexetais sobre *Phytophthora capsici* inoculada en plantas de pemento.

4.3. Ensaio do efecto da aplicación do extracto de *Urtica dioica* no crecemento das plantas de pemento.

Con respecto ás distintas medidas obtidas no estudo sobre o efecto do extracto de *Urtica dioica* sobre o crecemento da planta de pemento, non existen diferenzas estatisticamente significativas entre os distintos tratamentos en canto á altura, o número de follas e o peso seco (Fig. 10). Sen embargo, cabe destacar que no caso do número de flores, segundo a proba de Kruskal-Wallis, si que existen diferenzas significativas entre o tratamento control e a aplicación do extracto de ortiga en terra (Fig. 10).

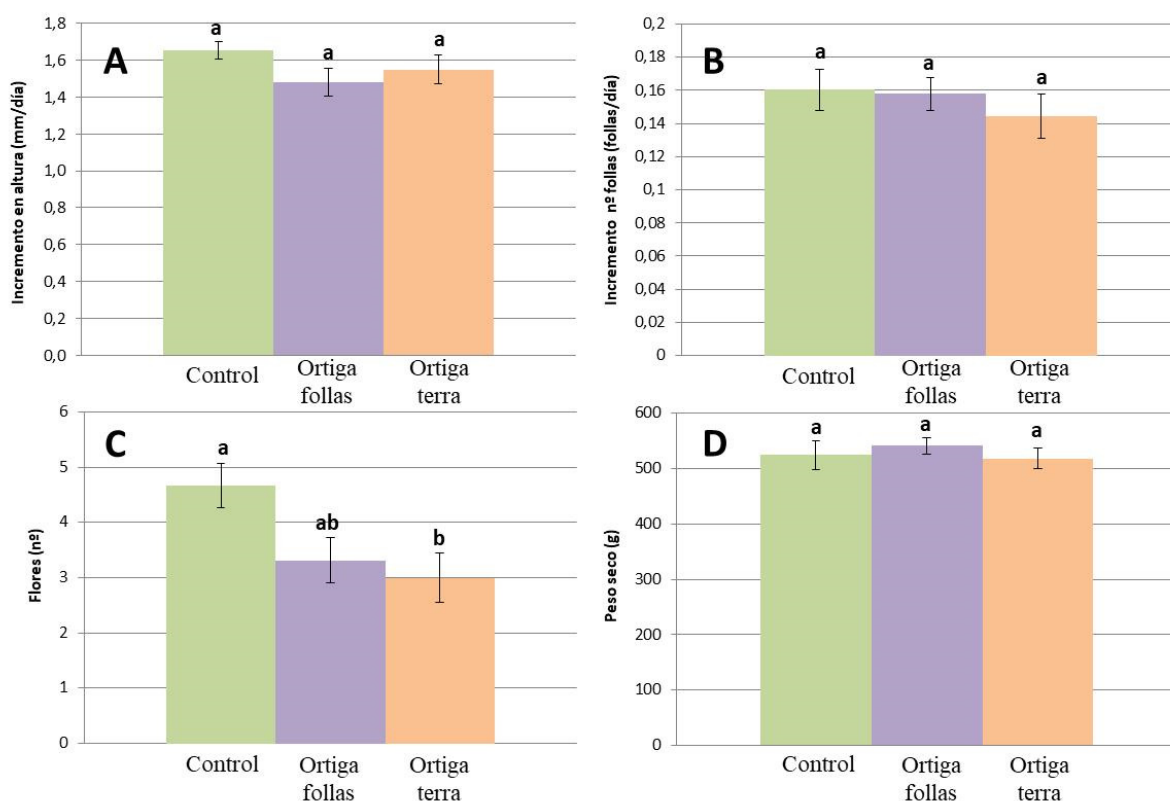


Fig. 10. Efecto dos distintos tratamentos sobre: A: incremento en altura (mm/día) de cada planta; B: incremento no número de follas (follas/día) de cada planta; C: número de flores de cada planta ao final do ensaio (35 días); D: peso seco (g) ao final do ensaio (35 días). As letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamentos.

5. Discusión

Nos últimos anos, o consumo de pemento aumentou debido ao seu uso como hortaliza, aditivo picante, colorante alimentario e en aplicacións medicinais, ademais de ser unha fonte importante de nutrientes esenciais para os consumidores (Barchenger *et al.*, 2018). Por outra banda, diversos patóxenos, como os estudados no presente traballo (*Botrytis cinerea* e *Phytophthora capsici*), provocan grandes perdas económicas polo que é necesario investigar novos antimicrobianos para utilizalos no seu control (da Rocha & Hammerschmidt, 2005; Govindarajan & Salzer, 1985).

Por outra banda, un reto importante para a produción agrícola é a necesidade de proporcionar medidas de control de enfermidades que axuden a manter a calidade dos produtos, á vez que se reduce o uso de pesticidas debido á contaminación e á aparición de resistencias nos patóxenos. Debido a isto, un campo de investigación moi importante na fitopatoloxía é o uso de indutores de resistencia que activan as defensas naturais das

plantas e protéxenas dun amplo espectro de patóxenos (da Rocha & Hammerschmidt, 2005; Walters *et al.*, 2013).

A resistencia tende a ser de amplo espectro e duradeira, aínda que rara vez completa, e pode inducirse en plantas mediante a aplicación de diversos axentes de orixe abiótico ou biótico, como son os extractos vexetais. Ademais, xa que a resistencia é unha resposta da planta, a súa expresión pode estar influenciada por unha serie de factores como as condicións ambientais ou o xenotipo da planta (Walters *et al.*, 2013).

En canto á actividade antimicrobiana, os resultados dos experimentos realizados en placa mostran que hai diferenzas significativas entre os tratamentos, agás no ensaio de *Botrytis cinerea* tratada con *Ginkgo*, aínda que parecen estimular o crecemento dos patóxenos en lugar de ter unha acción funxicida sobre os mesmos (Fig. 8).

En canto ao estudo da severidade e a AUPDC en *Phytophthora capsici*, ningún dos tratamentos presenta diferenzas estatisticamente significativas (Fig. 9), aínda que se fose posible avaliar os síntomas máis aló do terceiro día tras a inoculación e se tivera podido realizar o segundo experimento previsto (ambas cousas foron imposibles polo confinamento), é probable que se detectasen diferenzas significativas. A finalidade destes experimentos era ver si existía unha protección sistémica (os extractos aplícanse nas follas, pero o patóxeno inoculase no sustrato e penetra polas raíces) e en caso positivo medir algún tipo de sustancia de defensa nas raíces, como xa se ten feito con outros axentes de orixe biótico (García *et al.*, 2018). Sen embargo, estes resultados proceden dun só experimento independente, polo que deberían confirmarse con ensaios adicionais.

Xa se comentou na introdución que outros estudos demostraron o efecto antimicrobiano de compostos presentes en *Ginkgo biloba* e extractos de *Urtica dioica* (Begum *et al.*, 2002; Gülçin *et al.*, 2004; Romanazzi *et al.*, 2013). Sen embargo, non se atopou ningunha referencia bibliográfica na que se estudase a súa capacidade inductora de resistencia.

Con respecto ao estudo do crecemento das plantas de pemento, non existen diferenzas estatisticamente significativas entre os distintos tratamentos en canto á altura, o número de follas e o peso seco, mentres que no número de flores si se observan diferenzas. Esta diferenza no número de flores pode ser debida a que se produciu unha indución de resistencia, pois os xasmonatos, un grupo das fitohormonas implicadas na resistencia a patóxeno, tamén regula o desenvolvemento das flores (Li *et al.*, 2017). Ademais cando os xasmonatos causan unha regulación positiva das defensas da planta tamén regula negativamente o seu crecemento (Guo *et al.*, 2018). A resistencia inducida media unha

gama de respostas adaptativas nas plantas e provoca unha redución do crecemento e o desenvolvemento, ao inverter máis recursos na defensa. Ademais de servir como medida de control de enfermidades, isto pode ser beneficioso posto que ao producir menos flores, os futuros froitos poden ter maior tamaño e mellores propiedades (da Rocha & Hammerschmidt, 2005; Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2012).

6. Conclusións

1- Os extractos de *Ginkgo biloba* e *Urtica dioica* non presentan actividade fungicida *in vitro* fronte a *Botrytis cinerea* e *Phytophthora capsici*, estimulan o seu crecemento.

2- Atopáronse indicios de que os extractos de *Ginkgo biloba* e *Urtica dioica* poden inducir resistencia fronte a *Phytophthora capsici* nas plantas de pemento.

3- O extracto de *Urtica dioica* non ten un efecto significativo sobre o crecemento, agás no caso das flores, pois retrasa a súa formación.

Conclusiones

1- Los extractos de *Ginkgo biloba* y *Urtica dioica* no presentan actividad fungicida *in vitro* frente a *Botrytis cinerea* y *Phytophthora capsici*, estimulan su crecimiento.

2- Se encontraron indicios de que los extractos de *Ginkgo biloba* y *Urtica dioica* pueden inducir resistencia frente a *Phytophthora capsici* en las plantas de pimiento.

3- El extracto de *Urtica dioica* no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento, excepto en el caso de las flores, pues retrasa su formación.

Conclusions

1- The extracts of *Ginkgo biloba* and *Urtica dioica* do not show *in vitro* antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Phytophthora capsici*, they stimulate their growth.

2- We found some evidences that suggest the extracts of *Ginkgo biloba* and *Urtica dioica* can induce resistance against *Phytophthora capsici* in pepper plants.

3- *Urtica dioica* extract does not have a significant effect on growth, except in the case of flowers, since it delays their formation.

7. Bibliografía

Barchenger, D.W., Lamour, K.H., Bosland, P.W. 2018. Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 628.

Bari, R., Jones, J.D. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69, 473-488.

- Begum, P., Hashidoko, Y., Islam, M.T., Ogawa, Y., Tahara, S. 2002. Zoosporicidal activities of anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57, 874-882.
- Boller, T., Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379-406.
- Bowers, J., Papavizas, G., Johnston, S. 1990. Effect of soil temperature and soil-water matric potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. *Plant Disease*, 74, 771-777.
- Briskin, D.P. 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, 124, 507-514.
- Browse, J. 2009. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 183-205.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.-M., Simon, A., Viaud, M. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS microbiology letters*, 277, 1-10.
- Colmenares, A., Aleu, J., Duran-Patron, R., Collado, I., Hernandez-Galan, R. 2002. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 997-1005.
- da Rocha, A.B., Hammerschmidt, R. 2005. History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. *HortTechnology*, 15, 518-529.
- De, A.K. 2003. *Capsicum: the genus Capsicum*. CRC Press.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430.
- Doss, R.P. 1999. Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 404-408.
- Droby, S., Lichter, A. 2007. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. in: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N. (Eds.) *Botrytis: Biology, pathology and control*, Springer, pp. 349-367.

- Erwin, D.C., Ribeiro, O.K. 1996. Phytophthora diseases worldwide. American Phytopathological Society (APS Press).
- Estrada, B., Bernal, M., Merino, F. 2000. Pemento de Padrón. Transformacións bioquímicas na maduración. Xunta de Galicia.
- Feys, B.J., Parker, J.E. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. Trends in Genetics, 16, 449-455.
- Fillinger, S., Elad, Y. 2016. Botrytis: the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. Springer.
- Freeman, B.C., Beattie, G.A. 2008. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. The Plant Health Instructor, doi:10.1094/PHI-I-2008-0226-01.
- Fu, Z.Q., Dong, X. 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. Annual Review of Plant Biology, 64, 839-863.
- García, T., Veloso, J., Díaz, J. 2018. Vanillyl nonanoate induces systemic resistance and lignification in pepper plants. Journal of Plant Physiology, 231, 251-260.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology, 43, 205-227.
- Govindarajan, V., Salzer, U.J. 1985. Capsicum-production, technology, chemistry, and quality part 1: History, botany, cultivation, and primary processing. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 22, 109-176.
- Greenberg, J.T., Yao, N. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. Cellular Microbiology, 6, 201-211.
- Gül, S., Demirci, B., Başer, K.H.C., Akpulat, H.A., Aksu, P. 2012. Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 88, 666-671.
- Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M., Büyükkuroğlu, M.E. 2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). Journal of Ethnopharmacology, 90, 205-215.
- Guo, Q., Yoshida, Y., Majir, I.T., Wang, K., Sugimoto, K., Kapali, G., Havko, N.E., Benning, C., Howe, G.A. 2018. JAZ repressors of metabolic defense promote growth and

reproductive fitness in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 115, E10768-E10777.

Hausbeck, M.K., Lamour, K.H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. Plant disease, 88(12), 1292-1303.

Heil, M., Bostock, R.M. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. Annals of Botany, 89, 503-512.

Himejima, M., Kubo, I. 1991. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 418-421.

Ingle, R.A., Carstens, M., Denby, K.J. 2006. PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. Bioessays, 28, 880-889.

Irie, J., Murata, M., Homma, S. 1996. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase inhibitors, anacardic acids, from *Ginkgo biloba*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 60, 240-243.

Jaggy, H., Koch, E. 1997. Chemistry and biology of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. Die Pharmazie, 52, 735.

Ji, T., Liu, C., Wang, A., Yang, J., Su, Y., Yuan, L., Feng, X. 2007. Studies on the chemical constituents of *Urtica dioica* L. grown in Tibet Autonomous Region. Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese Medicinal Materials, 30, 662-664.

Jones, J.D., Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. Nature, 444, 323-329.

Joshi, B.C., Mukhija, M., Kalia, A.N. 2014. Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. International Journal of Green Pharmacy, 8, 201-209.

Katagiri, F., Tsuda, K. 2010. Understanding the plant immune system. Molecular Plant-Microbe Interactions, 23, 1531-1536.

Kazan, K., Manners, J.M. 2009. Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. Trends in Plant Science, 14, 373-382.

Ko, W.-h. 1988. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. Annual Review of Phytopathology, 26, 57-73.

Kubo, I., Kinst-Hori, I., Yokokawa, Y. 1994. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. Journal of Natural Products, 57, 545-551.

- Lamour, K.H., Stam, R., Jupe, J., Huitema, E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13, 329-337.
- Li R, Wang, M., Wang, Y., Schuman, M.C., Weinhold, A., Schäfer, M., Jiménez-Alemán, G.H., Barthel, A., Baldwin, I.T. 2017. Flower-specific jasmonate signaling regulates constitutive floral defenses in wild tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 114, E7205–E7214.
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., Klessig, D.F. 2010. NO synthesis and signaling in plants—where do we stand? *Physiologia Plantarum*, 138, 372-383.
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., Yoshida, S. 2003. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *The Plant Journal*, 33, 887-898.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., Jones, J.D. 2008. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology*, 18, 650-655.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198, 249-266.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5, 308-316.
- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489-521.
- Pieterse, C.M., Van Loon, L. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 456-464.
- Pochard, E. 1966. Données expérimentales sur la selection du piment *Capsicum annum* L. *Ann Amélior Plantes*, 16, 185-197.
- Poves, L.T., Paz, J.F., Bao, J.M.R., Ares, J.L.A., Martínez, A.R. 2004. Pimientos autóctonos de Galicia. *Horticultura Internacional*, 43, 34-40.

- Romanazzi, G., Feliziani, E., Santini, M., Landi, L. 2013. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 24-27.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 8, 1809.
- Shobha, S., Ramadoss, C.S., Ravindranath, B. 1994. Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by anacardic acids, cardols, and cardanols. *Journal of Natural Products*, 57, 1755-1757.
- Taboada Arias, A.R.M., A; Pomar Barbeito, F; Rodríguez Bao J. M.; Terrén Povés, L; Ribeiro Leira, M. 2003. Caracterización morfológica y agronómica de pimientos autóctonos de Galicia. *Actas de Horticultura*, 39, 117-119
- Ton, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14, 310-317.
- van Kan, J.A. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11, 247-253.
- Van Loon, L. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 753-765.
- van Loon, L.C., Geraats, B.P., Linthorst, H.J. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 11, 184-191.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.M.A., Klessig, D.F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177-206.
- Walters, D.R., McRoberts, N. 2006. Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science*, 11, 581-586.
- Walters, D.R., Ratsep, J., Havis, N.D. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64, 1263-1280.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J.A. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 561-580.
- Xunta de Galicia. 2019. Anuario de Estadística Agraria 2019. Consellería de Agricultura, Gandería e Política Alimentaria, Santiago de Compostela.
- Żarnowska, E.D., Żarnowski, R., Kozubek, A. 2000. Alkylresorcinols in fruit pulp and leaves of *Ginkgo biloba* L. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55, 881-885.