



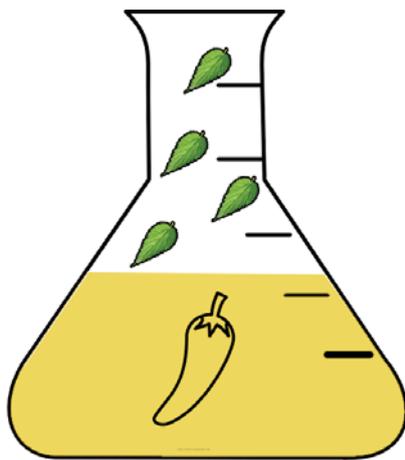
Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Trabajo de Fin de Máster

Diseño de un proyecto de investigación: Estudio de la inducción de resistencia en suspensiones celulares de pimiento elicidadas con extractos de ortiga

Design of a research project: Study of the induction of resistance in cellular suspensions of pepper elicited with nettle extracts

Deseño dun proxecto de investigación: Estudo da inducción de resistencia en suspensións celulares de pemento elicidadas con extractos de estruga



Autora:
Uxía Vila Amoedo

Directores:
Ángeles Bernal Pita da Veiga
Néstor Carillo Barral



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Trabajo de Fin de Máster

Diseño de un proyecto de investigación: Estudio de la inducción de resistencia en suspensiones celulares de pimiento elicidadas con extractos de ortiga

Design of a research project: Study of the induction of resistance in cellular suspensions of pepper elicited with nettle extracts

Deseño dun proxecto de investigación: Estudio da inducción de resistencia en suspensións celulares de pemento elicidadas con extractos de estruga

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Dra. María de los Ángeles Bernal Pita da Veiga y Dr. Néstor Carrillo Barral, en calidad de tutores de este trabajo, autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Máster "Diseño de un proyecto de investigación: Estudio de la inducción de resistencia en suspensiones celulares de pimiento elicidadas con extractos de ortiga", presentado por Uxía Vila Amoedo para su defensa ante el Tribunal Evaluador.

En A Coruña, a 11 de diciembre del 2020.

Fdo.: Ángeles Bernal Pita da Veiga

Fdo.: Néstor Carrillo Barral

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Resumen/Resumo/Abstract | 1 |
| 2. Antecedentes y el estado actual de la cuestión | 3 |
| Cultivo <i>in vitro</i> | 3 |
| Resistencia inducida | 4 |
| Genes implicados en la respuesta defensiva | 6 |
| Elicitación | 7 |
| Radicales libres y actividad antioxidante | 8 |
| Peroxidasa | 9 |
| Metabolismo secundario | 9 |
| Fenoles | 10 |
| Fitoalexinas | 11 |
| <i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>annuum</i> | 11 |
| Extractos de ortiga (<i>Urtica dioica</i>) | 13 |
| 3. Hipótesis | 15 |
| 4. Objetivos | 15 |
| 5. Metodología | 15 |
| Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> | 15 |
| Material biológico: plantas <i>in vitro</i> | 15 |
| Inducción de callos y repicado | 16 |
| Suspensiones celulares | 17 |
| Medios de cultivo | 17 |
| Elicitación de las suspensiones celulares | 18 |
| Obtención de los extractos de Ortiga | 18 |
| Preparación de suspensiones celulares para elicitación | 19 |
| Elicitación de las suspensiones celulares | 19 |
| Recogida y procesado de muestras | 20 |
| Determinación del contenido total de fenoles y actividad antioxidante | 21 |
| Extracción de fenoles y sustancias antioxidantes del medio celular | 21 |
| Determinación del contenido total de fenoles | 21 |
| Determinación de la actividad antioxidante | 22 |
| Extracción de proteínas totales | 22 |
| Determinación del contenido total de proteínas | 23 |
| Determinación de la actividad peroxidasa | 23 |
| Determinación de la expresión de genes | 24 |
| Extracción de ARN | 24 |
| Síntesis de cDNA | 24 |

| | |
|---|-----------|
| PCR en tiempo real | 24 |
| Análisis estadístico | 26 |
| 6. Plan de trabajo | 26 |
| 7. Cuestiones éticas | 27 |
| 8. Aplicabilidad | 27 |
| 9. Plan para la difusión de los resultados | 27 |
| 10. Recursos necesarios | 28 |
| Recursos disponibles en el laboratorio | 28 |
| Recursos y servicios a adquirir | 29 |
| 11. Bibliografía | 31 |

1. Resumen/Resumo/Abstract

Resumen

En el entorno que rodea a un organismo vegetal se encuentran un gran número de competidores potenciales, predadores y patógenos. Aunque únicamente un bajo porcentaje de ellos llegue a atacar a la planta, los que lo consiguen provocan al sector agrícola grandes pérdidas económicas. La supervivencia de la planta dependerá de su capacidad para desarrollar mecanismos de defensa. Por ello, la biotecnología vegetal está en constante busca de nuevas técnicas y productos que refuercen el sistema de defensa de las plantas, sin hacer uso de pesticidas o fungicidas que en ocasiones pueden producir daños sobre el ecosistema.

El cultivo *in vitro* consigue optimizar la experimentación, permitiendo la propagación de una gran cantidad de organismos vegetales en un pequeño espacio y facilitando ensayos que *in vivo* serían más laboriosos. Además, mediante este método de propagación también se pueden realizar experimentos de elicitación; inducción de respuestas defensivas en la planta que aumentan la resistencia de la misma por medio de moléculas producidas por agentes bióticos o abióticos.

En el presente proyecto se plantean diferentes ensayos *in vitro* cuya finalidad es determinar si existe una inducción de resistencia en suspensiones celulares de *Capsicum annum* L. var. *annuum* (pimiento) al ser elicidadas con extractos de *Urtica dioica* (ortiga). Para analizar la capacidad elicitora de la ortiga se iniciarán suspensiones de pimiento a partir de plantas *in vitro*, se elicitarán con tres extractos de ortiga y posteriormente se medirán diferentes marcadores de respuesta defensiva de la planta. Este método permitirá de manera rápida seleccionar aquel o aquellos extractos de ortiga que más interesen para una posible aplicación en campo.

Resumo

No entorno que rodea a un organismo vexetal encóntranse un gran número de competidores potenciais, predadores e patóxenos. Aínda que unicamente un baixo porcentaxe deles chegue a atacar á planta, os que o logran provocan ao sector agrícola grandes perdas económicas. A supervivencia da planta dependerá da capacidade que teña para desenvolver mecanismos de defensa. Por elo, a biotecnoloxía vexetal está nunha búsqueda constante de novas técnicas e produtos que reforcen o sistema de defensa das plantas, sen facer uso de pesticidas ou fungicidas que en ocasións producen danos sobre o ecosistema.

O cultivo *in vitro* logra optimizar a experimentación, permitindo a propagación dunha gran cantidade de organismos vexetais nun pequeno espazo e facilitando ensaios que *in vivo* serían

máis laboriosos. Ademais, mediante este método de propagación tamén se poden realizar experimentos de elicitación; inducción de respostas defensivas na planta que aumentan a resistencia da mesma por medio de moléculas producidas por axentes bióticos ou abióticos.

No presente proxecto plantéanse diferentes ensaios *in vitro* coa finalidade de determinar se existe unha inducción de resistencia en suspensions celulares de *Capsicum annum* L. var. *annum* (pemento) ao ser elicitadas con extractos de *Urtica dioica* (estruga). Para analizar a capacidade elicitora da estruga iniciaranse suspensións de pemento a partir de plantas *in vitro*, elicitaranse con tres extractos de estruga e posteriormente mediranse diferentes marcadores de resposta defensiva. Este método permitirá dun xeito rápido elixir aquel o aqueles extractos de estruga que máis interesen para unha posible aplicación en campo.

Abstract

A large number of potential competitors, predators and pathogens are found in the environment surrounding a plant organism. Although just a small percentage of them manage to attack the plant, those who succeed cause to the agricultural sector huge economic losses. The survival of the plant will depend on its ability to develop defense mechanisms. Therefore, plant biotechnology is constantly looking for new techniques and products that reinforce the defense system of plants, without using pesticides or fungicides that sometimes cause ecosystem damage.

In vitro culture achieves optimization of experimentation, it allowing the propagation of a great amount of vegetal organisms in a small space and facilitating experiments that would be more laborious *in vivo*. In addition, by this method of propagation, elicitation experiments can also be carried out. Elicitation is defined as the induction of defensive responses in the plant that increase its resistance using molecules produced by biotic or abiotic agents.

In the present project, different *in vitro* tests are proposed to determine if there is an induction of resistance in cellular suspensions of *Capsicum annum* L. var. *annum* (pepper) when elicited with extracts of *Urtica dioica* (nettle). In order to analyze the elicitation capacity of the nettle, pepper suspensions from *in vitro* plants will be initiated and elicited with three nettle extracts. Different defensive response markers of the plant will be measured. This method will allow a quick selection of the most interesting nettle extracts for a possible application in the field.

2. Antecedentes y el estado actual de la cuestión

Cultivo *in vitro*

Se conoce como cultivo *in vitro* de plantas al crecimiento de células, tejidos u órganos vegetales a partir de un explante (protoplasto, célula, tejido u órgano), bajo unos parámetros ambientales controlados (luz, humedad y temperatura), en condiciones de asepsia y en un medio nutritivo de composición conocida (Sharry *et al.*, 2015; Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

Desde finales del siglo XIX los estudios sobre el comportamiento de los tejidos vegetales, las células que los componen y el desarrollo de medios de cultivo para este procedimiento ha ido en aumento. En 1902 el botánico austriaco Gottlieb Haberlandt plantea el primer cultivo de células vegetativas aisladas en suspensión aunque no logra la división de estas células. En los años 30 se establecen los primeros cultivos *in vitro* propiamente dichos por White en EEUU (1934) y por Gautheret en Francia (1939). En 1950 se asentó la composición de los medios nutritivos actuales con la modificación de la formulación de la solución Hoagland (Hoagland y Snyder, 1933) por Hoagland y Arnon (Hoagland y Arnon, 1950; Sharry *et al.*, 2015). En España no se conocen publicaciones oficiales sobre este tema hasta 1963, cuando el Dr. Ernesto Viéitez y la Dra. Adelina Vázquez publican el primer trabajo de investigación de cultivo *in vitro* en España (Ballester, 2007).

Todos estos estudios han llevado a que el cultivo *in vitro* sea en la actualidad una de las técnicas esenciales en la industria vegetal, permitiendo con independencia estacional, geográfica y ambiental el crecimiento de plantas con alta uniformidad, con características genéticas favorables para su comercialización y resistentes a plagas y otras enfermedades (Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

La experimentación con cultivos *in vitro* presenta una serie de ventajas respecto a los cultivos *in vivo*, principalmente la reducción del espacio de trabajo y de los tiempos de crecimiento. Al estar trabajando con explantes, el área ocupada por cada organismo se reduce, además de que no se hace indispensable esperar al crecimiento completo de la planta para realizar determinados ensayos.

Dentro del cultivo *in vitro* existen gran variedad de técnicas siendo las más utilizadas la organogénesis y la callogénesis. La primera de ellas, la organogénesis, se define como la producción de órganos vegetales (raíces o tallos habitualmente) de manera directa a partir de meristemos, o de forma indirecta por medio de callos. Mediante la organogénesis se puede conseguir la producción masiva de individuos vegetales completos. Por el contrario, la callogénesis implica la formación de callo (Figura 1), masa amorfa de células indiferenciadas totipotentes, al someter un explante (raíz, tallo, hoja, flor...) a un tratamiento hormonal

específico que desencadena la dediferenciación. Mediante la formación de callos se pueden regenerar organismos completos, generar embriones o iniciar suspensiones celulares (Morales-Rubio *et al.*, 2016).



Figura 1. Callo de pimiento (Cortesía de la Dra. Ángeles Bernal)

Las suspensiones celulares se definen como agregados celulares o células libres distribuidas en un medio líquido en agitación (Abdelnour, 1994). Para conseguir este cultivo se transfiere a un medio líquido un callo friable (con elevado ritmo de reproducción celular y un color blanquecino) y se mantiene en condiciones controladas de aireación, luz y temperatura. Es necesario también mantenerlas en agitación continua para romper los agregados celulares. Para aumentar la división celular de estas suspensiones es recomendable hacer subcultivos periódicos evitando que la solución alcance el punto de saturación, lo que haría perder el crecimiento exponencial (Morales-Rubio *et al.*, 2016).

Las suspensiones celulares son una buena herramienta a elegir para conocer el comportamiento metabólico, fisiológico y bioquímico de un organismo vegetal, gracias a que diseccionan la complejidad de este en sus unidades fundamentales. Además, las células en suspensión poseen una delgada pared y están en constante agitación facilitando así la aplicación y el análisis de las respuestas a determinados tratamientos (Moscatiello *et al.*, 2013).

Para conseguir un cultivo en suspensión óptimo es imprescindible un buen medio de cultivo que contenga una concentración de nutrientes, sales y reguladores del crecimiento adecuada. Uno de los medios de cultivo más utilizados es el medio Murashige y Skoog (MS) formado por altas concentraciones de nitrógeno y sales (Murashige y Skoog, 1962).

Resistencia inducida

Las plantas son organismos sésiles, por lo que han ido desarrollando estrategias de defensa y adaptación que ayudan y mitigan los efectos derivados de la presencia de un estrés biótico (depredadores) o abiótico (estrés hídrico, altas temperaturas...; Knudsen *et al.*, 2018).

El proceso para lograr la defensa contra un patógeno consta mayormente de dos pasos. El primero es el reconocimiento del factor de estrés, para ello la planta cuenta con receptores

capaces de reconocer determinadas moléculas conocidas como PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*), DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*) o efectores. Los PAMPs son sustancias que forman parte del patógeno, normalmente compuestos de su pared como peptidoglicanos o lipopolisacáridos. Los DAMPs sin embargo hacen referencia a moléculas de la propia planta causadas tras el daño, como por ejemplo proteínas apoplásticas y componentes citoplasmáticos. Otros receptores son capaces de unirse a efectores, proteínas que son deliberadamente secretadas por un patógeno para enmascararse y así engañar al sistema defensivo de la planta. Una vez reconocidos alguno de estos patrones se produce una transducción de la señal que tiene como resultado la inducción de los mecanismos de defensa de la planta (Henry *et al.*, 2012; Macho y Lozano, 2019).

Los mecanismos por los que se activan las defensas vegetales son complejos, pero en general sería de la siguiente forma. Primero se producen una cascada de MAPK's (MAP quinasas), modificaciones de la cromatina y alteraciones del metabolismo primario. Estas respuestas tempranas modularán la expresión de los genes de defensa a través de factores de transcripción, y a su vez la expresión de estos genes provocará la síntesis de proteínas de defensa, como las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), y la acumulación de ciertas sustancias defensivas que veremos más adelante que guiarán a la planta hacia la resistencia a los patógenos (Delaunoy *et al.*, 2014).

Los mecanismos defensivos de las plantas se pueden clasificar en base a diferentes criterios. Según su naturaleza pueden ser bioquímicos como las fitoanticipinas, o estructurales como la cutícula celular, las ligninas o los tricomas. Según la necesidad o no de contacto previo con el factor desencadenante de dicha defensa encontramos los mecanismos defensivos constitutivos y los mecanismos defensivos inducidos. Los primeros están presentes en la planta antes del ataque del patógeno o estrés abiótico, mientras que los mecanismos defensivos inducidos son activados tras la aparición del agente causante del estrés. Las defensas inducidas, dependiendo de la zona donde se desarrollen, pueden ser locales si se activan en la zona de ataque del agente, o sistémicas si se activan en áreas del organismo vegetal donde el agente no tuvo contacto. En ocasiones, la respuesta local provoca cambios que desencadenan una señal que se propaga por toda la planta y activa la respuesta sistémica (Sharma, 2004; García *et al.*, 2018).

La resistencia sistémica se puede clasificar, según la naturaleza del factor desencadenante y las vías de regulación implicadas, en resistencia sistémica adquirida, SAR, o resistencia sistémica inducida, ISR. La resistencia sistémica adquirida se activa por la exposición de la planta a patógenos o factores abióticos, además está asociada normalmente a altos niveles de ácido salicílico y a la síntesis de proteínas PR. Por el contrario, la ISR está asociada a la colonización

de las raíces de las plantas por ciertas cepas de rizobacterias y hongos promotores del crecimiento (PGPR y PGPF), está mediada principalmente por el ácido jasmónico y el etileno y no implica la síntesis de proteínas PR (Figura 2) (Kamle *et al.*, 2020).

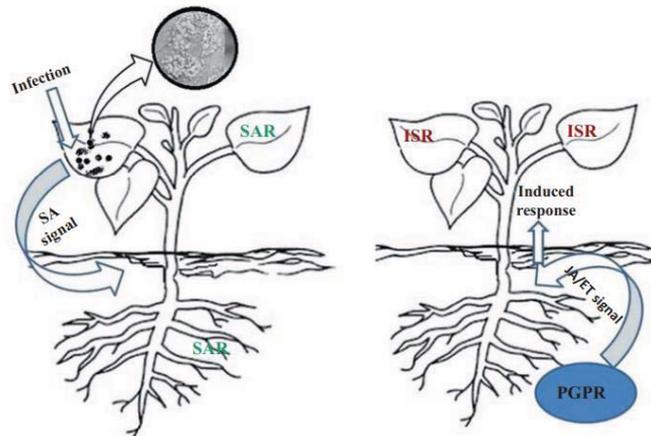


Figura 2. Representación de las respuestas del SAR y el ISR junto a su mecanismo de respuesta (Kamle *et al.*, 2020).

Genes implicados en la respuesta defensiva

Uno de los mecanismos asociados a la resistencia inducida es la activación de determinados genes implicados en la defensa. En este trabajo se propone el estudio de 3 de estos genes en pimiento (*Capsicum annuum*):

- *CaBPR1*: Este gen codifica una proteína básica relacionada con la patogénesis, PR-1. Este tipo de proteínas se acumulan por el ataque de bacterias, Oomycetes u hongos patógenos, pero también se han observado tras un estrés abiótico por radiación UV. Además esta proteína tendría un papel fundamental en la resistencia sistémica adquirida (SAR) desempeñando funciones en la restricción del desarrollo y la propagación de patógenos en la planta (Hong *et al.*, 2005)
- *CaSC1* La enzima sesquiterpeno ciclasa es codificada por este gen. Esta proteína catalítica participa en la síntesis de la fitoalexina capsidiol. La síntesis y acumulación de fitoalexinas es una de las respuestas de las plantas al estrés abiótico y al ataque de patógenos, estando su presencia asociada a la elicitación. La expresión de este gen se ha relacionado con la resistencia a ciertos Oomycetes que atacan al pimiento (Silvar *et al.*, 2008).
- *CaPO1*: Este gen codifica una peroxidasa básica por lo que ha sido asociado con procesos de lignificación y respuesta a patógenos que atacan al pimiento (García *et al.*, 2015).

Elicitación

Algunas de las técnicas más empleadas para conseguir la resistencia a plagas u otro tipo de patógenos tienen como objetivo promover la inducción de los mecanismos de defensa de la planta. Existen métodos que consiguen la activación de este tipo de mecanismos por medio de moléculas producidas por agentes bióticos o abióticos que se conocen como elicitores. Un elicitore se define como un factor o molécula de diverso origen que introducida a bajas concentraciones en un sistema celular vivo, es capaz de perturbar el metabolismo. Según su origen y estructura molecular los elicitores se clasifican en dos categorías: elicitores bióticos si su origen es biológico y elicitores abióticos si su origen es no biológico. Estos últimos comprenden compuestos inorgánicos como sales, o factores físicos como temperatura o luz. Los elicitores bióticos incluyen moléculas derivadas de plantas, patógenos vegetales u otros organismos no patogénicos. Las moléculas más utilizadas son ciertas fitohormonas, polisacáridos, oligosacáridos, proteínas, ácidos grasos y extractos diversos (Liu *et al.*, 2019). La biotecnología de la elicitación se ha abierto paso durante estos años gracias a su gran aplicabilidad. De manera indirecta, aumentar la defensa de las plantas y alterar su metabolismo genera un beneficio a múltiples industrias, como la de la cosmética natural o *cruelty free* que necesita gran cantidad de organismos vegetales con un buen estado fisiológico y sanitario para sus productos. Igualmente, en la industria farmacéutica se utilizan las plantas para la síntesis de compuestos farmacológicos imprescindibles para tratar diversas patologías (González y Bravo, 2017).

No obstante, el sector que vería un mayor beneficio con el desarrollo de las técnicas elicitoras sería el sector agrícola. Los agricultores tienen que hacer frente a numerosas adversidades abióticas (sequía, anegamiento, incendios...) y bióticas (malas hierbas, patógenos de vegetales, animales...) que dañan sus cultivos. En el periodo que abarca los años 2001-03 se calculó que alrededor del 35% de los cultivos de cebada, semillas de algodón, maíz, colza, patatas, arroz, soja, algodón, remolacha azucarera, tomates y trigo eran perdidos a causa de plagas. Estos daños se intentan remediar con la utilización de plaguicidas, sin embargo, el uso de estas sustancias tiene varios inconvenientes. Por un lado la pérdida de biodiversidad, ocasionada por la eliminación de organismos que cohabitan con el patógeno o por acumulación en la cadena trófica, alcanzando concentraciones letales para seres vivos que no son diana del plaguicida. Otro gran inconveniente es la generación de resistencias, una exposición prolongada a estas sustancias podría ocasionar organismos patogénicos que no se viesen afectados negativamente. Estos al reproducirse aumentarían el número de patógenos resistentes impidiendo que el

plaguicida lograra su objetivo, acabar con la plaga (Oerke, 2006; Bielza *et al.*, 2019; Le Goff y Giraud, 2019).

Es por todo esto que, si se quiere mantener el nivel de producción y rendimiento actual, es importante una mayor investigación en técnicas como la elicitación que evitan el uso de sustancias que pueden ser perjudiciales para las especies y su ambiente. El cultivo *in vitro* es una buena opción para este tipo de experimentos porque posibilita, en menos tiempo y espacio, probar diferentes agentes y analizar la respuesta defensiva de la planta a estos.

Radicales libres y actividad antioxidante

La oxidación de las moléculas en las células ocurre habitualmente por la presencia de radicales libres, especies químicas producidas normalmente como productos de desecho del metabolismo y que muestran al menos un electrón desapareado en su orbital externo, lo que les otorga una configuración espacial inestable. Esta inestabilidad electroquímica hace que tiendan a captar electrones de otras moléculas logrando la estabilidad, sin embargo esto a su vez provoca una cascada de oxidaciones que producen daños y cambios estructurales en las células, resultando en la pérdida de función y degradación de ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas (Rivas-Morales *et al.*, 2016).

Los radicales libres más estudiados son aquellos que forman parte de especies reactivas de oxígeno (ROS). Dentro de las ROS se encuentran sustancias como el radical superóxido (O_2^-) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se considera un intermediario estable relacionado con los radicales de oxígeno, y el radical hidroxilo (OH; Hasanuzzaman *et al.*, 2019).

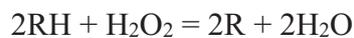
Las especies reactivas pueden ser producidas por la propia célula de manera endógena: en la cadena de transporte de electrones, en los cloroplastos o en reacciones de oxidación; o de manera exógena: por absorción de metales pesados, radiación UV-B, anegamiento o ataque de patógenos y otros depredadores. Estas sustancias, a bajas concentraciones, son necesarias para la célula vegetal ya que pueden actuar de segundos mensajeros activando enzimas de la membrana celular, o en rutas hormonales participando en procesos como la diferenciación del tejido vascular, la senescencia o la floración. Sin embargo, el exceso de especies reactivas de oxígeno está relacionado con ciertas patologías como necrosis, clorosis o problemas en la germinación que pueden desencadenar la muerte de la planta (Venereo, 2002; Mhamdi y Van Breusegem, 2018; Hasanuzzaman *et al.*, 2019).

La célula vegetal cuenta con sistemas antioxidantes que actúan como mecanismo de defensa contra los radicales libres. Podemos definir la actividad antioxidante como aquella que previene

o impide la oxidación de ciertas moléculas biológicas como proteínas, lípidos o ADN (Rivas-Morales *et al.*, 2016).

Peroxidasa

Las peroxidasas son proteínas con actividad catalítica bisustrato de carácter *redox*, con un grupo hemo y localizadas fundamentalmente en las mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas celulares. Su principal función es la oxidación de sustratos concretos, necesarios para determinadas reacciones químicas celulares. La peroxidasa se une a un sustrato oxidante, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que oxida a otro sustrato de carácter reductor, dando como resultado la conversión del peróxido en dos moléculas de agua (Vicuna, 2005; Caverzan *et al.*, 2012).



Entre los diferentes tipos de peroxidasas se encuentra la ascorbato peroxidasa (APX). Esta proteína catalítica utiliza como sustrato reductor el ascorbato y está involucrada en la principal vía celular de desintoxicación del peróxido de hidrógeno, el ciclo del ascorbato-glutation. Concretamente la APX participa en la primera fase del ciclo, generando a partir del peróxido de hidrógeno y del ascorbato dos moléculas de agua y disulfuro de glutatión (Caverzan *et al.*, 2012).

Las peroxidasas también intervienen en la defensa estructural, por ejemplo, mediante la lignificación de la pared celular. Concretamente estas enzimas participan en el último paso de la ruta; la polimerización de los alcoholes cinamílicos a ligninas (Vicuna, 2005; García *et al.*, 2018).

Metabolismo secundario

A diferencia de otros seres vivos las plantas además de contar con un metabolismo primario, que se ocupa de la producción de moléculas esenciales para el desarrollo de la planta (aminoácidos, nucleótidos, glúcidos...), presentan un metabolismo secundario.

Los metabolitos secundarios se pueden definir como compuestos químicos, de limitada distribución en el reino de las plantas, que se producen en pequeñas cantidades y que no realizan funciones directas en procesos fotosintéticos, respiratorios, de asimilación de nutrientes, de transporte de solutos o de síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos pero que dotan a las plantas de unas ventajas selectivas en las interacciones de estas con el ambiente. Asimismo, estas sustancias cuentan con un gran valor farmacológico y económico por sus beneficios para la salud tanto vegetal como humana (Valares, 2011; Guerriero, 2018).

Los metabolitos secundarios se pueden agrupar en cuatro categorías según sus rutas biosintéticas; compuestos fenólicos, terpenos, compuestos nitrogenados y alcaloides, siendo los fenoles y los terpenos los grupos más relacionados con la defensa (Chinou, 2008).

Fenoles

Los fenoles son, junto a los terpenos, el grupo de metabolitos secundarios más abundante. Se definen como compuestos químicos que en su estructura presentan al menos un grupo fenol, un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos, y se clasifican en función de su número de anillos aromáticos y de su esqueleto de carbono (Figura 3). Los fenoles más conocidos son los ácidos fenólicos, las cumarinas, los taninos, las ligninas y los flavonoides, siendo estos últimos los más diversos y con mayor representación en las plantas (Martín Gordo, 2018).

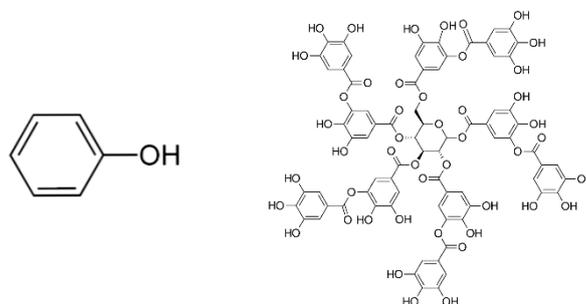


Figura 3. Estructura química de un fenol simple y uno complejo (Nollet y Gutierrez, 2018)

Los fenoles o compuestos fenólicos desempeñan diferentes funciones en las plantas, entre ellas soporte mecánico, coloración de las flores y frutos, atracción de insectos polinizadores o, la que cuenta con un mayor interés para el desarrollo de este proyecto, la defensa vegetal (Valares, 2011; Nollet y Gutierrez, 2018).

Como comentamos anteriormente las especies reactivas pueden ser producidas tras el ataque de un patógeno o ante un estrés abiótico. Los fenoles cuentan con una alta capacidad antioxidante que previene el daño causado por estas sustancias. Esto es posible gracias a que son muy susceptibles de sufrir oxidación, por lo que reaccionarán con las especies oxidantes antes que otras moléculas vegetales (proteínas, nutrientes, azúcares, etc.). Mediante quelación de iones metálicos, retención de formas moleculares de oxígeno activo y disminución de la fluidez de la membrana, dificultan la difusión de los radicales libres. Además, algunos compuestos fenólicos pueden recuperar su estado reducido y restablecer la capacidad antioxidante (Hasanuzzaman *et al.*, 2019).

Esta actividad antioxidante también ha sido estudiada en los seres humanos. En diversas patologías como el cáncer, cardiopatías y enfermedades relacionadas con la edad se ha demostrado que los compuestos fenólicos evitan el estrés oxidativo, lo que los posiciona como

buenos sustitutos de otros compuestos de origen sintético que pueden generar sustancias tóxicas en su degradación (Carvalho *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2015).

A parte de con la actividad antioxidante, los fenoles participan de más maneras en la defensa de la planta. La lignina, un polímero polifenólico, interviene en la defensa estructural protegiendo a la planta de los excesos de absorción de radiación UV y sobre todo dificulta la entrada de patógenos al ser un componente de la pared celular vegetal. Otros mecanismos defensivos de los fenoles implican la reducción de la digestibilidad por cambios en la actividad enzimática. Por ejemplo, inhibiendo la Ca^{2+} -ATPasa se impide el transporte de Ca^{2+} a través de las membranas del retículo sarcoplásmico, esto provoca a los herbívoros la incapacidad de relajar el músculo facial imposibilitándoles masticar la planta (Valares, 2011).

Fitoalexinas

Dentro de los metabolitos secundarios también se encuentran las fitoalexinas, grupo heterogéneo de moléculas con bajo peso molecular y propiedades antimicrobianas. Estos compuestos se sintetizan y acumulan en grandes concentraciones en las plantas como respuesta a daños mecánicos o exposición ante un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas. Algunas de sus acciones de defensa antifúngica son: la inducción de la muerte celular programada de tipo apoptótico, la inhibición de la elongación del tubo germinal y del crecimiento y aumento de peso seco de su micelio radial. También se ha visto efecto sobre la movilidad de las zoosporas y rotura de la membrana celular (Singh y Chandrawat, 2017). Entre las fitoalexinas más estudiadas se encuentra el capsidiol, un terpeno con 15 carbonos (sesquiterpeno) que se encuentra en especies como el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el pimiento (*Capsicum annuum*) y ha demostrado su acción contra Oomycetes del género *Phytophthora* (Giannakopoulou *et al.*, 2014; Nollet y Gutierrez, 2018).

Capsicum annuum* L. var. *annuum

Dentro de la clase Magnoliopsida, en la familia Solanaceae, se encuentra la especie *Capsicum annuum* L., más conocida como pimiento, chile o guindilla. *C. annuum* es, junto a *C. chinense* Jacq., *C. pubescens* (Ruiz & Pav.) y *C. baccatum* L., una de las especies del género *Capsicum* con mayor extensión de cultivo (Khan *et al.*, 2014).

Esta planta es herbácea, anual o perenne y semiarbusciva llegando a una altura de 200 cm si se cultiva en invernadero. A partir del tallo principal, ramificado dicotómicamente, aparecen de manera alternada las hojas. Estas poseen un pecíolo largo, son lobuladas, enteras, lisas y con un ápice muy pronunciado. Sin embargo, la característica más distintiva de la especie *Capsicum annuum*, y por la que posee una alta importancia económica, es su fruto en baya, el cual puede

ser muy variable en tamaño, forma y color (Figura 4). Además algunos de estos frutos pueden presentar pungencia debido a un metabolito secundario alcaloide, la capsaicina, que la planta sintetiza en respuesta al desarrollo del fruto y en situaciones de estrés (Estrada *et al.*, 2000; Reche, 2010).



Figura 4. Fruto de *Capsicum annuum*

El pimiento es nativo de América Central y América del Sur. Los estudios datan en el 7500 a.C. su integración en la dieta humana, y entre el 5200 y 3400 a.C. su domesticación por los nativos americanos (Khan *et al.*, 2014). En España se fue introduciendo a partir de 1493, tras los primeros viajes a América, y desde ese momento su extensión por todo el continente europeo, Asia y medio Oriente ha ido en aumento hasta el día de hoy. Actualmente está considerado el séptimo fruto más consumido en el mundo (Paes *et al.*, 2019).

Los cientos de años desde la introducción del pimiento en España hasta la actualidad han permitido un alto proceso de selección y creación de ecotipos adaptados al ambiente peninsular. El pimiento de Padrón es un ecotipo con una gran importancia en el país, adquiriendo en 2009 la Denominación de Origen protegida bajo el nombre de pimiento de Herbón (EC N° 510/2006, 2009; Pereira-Dias *et al.*, 2019)

La importancia del pimiento depende mayormente de su valor nutricional, ya que este fruto goza de una composición rica en moléculas esenciales en la dieta humana como proteínas, grasas, vitaminas, carotenoides y minerales (Tripathi y Mishra, 2009; Ismail *et al.*, 2011). No obstante, este no es el único motivo por el que el pimiento es un fruto de enorme interés. Este alimento posee alta importancia farmacológica como consecuencia de su elevada concentración en compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias y anticancerígenas. Entre estas sustancias farmacológicas se encuentra la capsaicina, nombrada anteriormente por producir esa sensación de picante en algunos frutos, pero también otros compuestos como el licopeno, el ácido ascórbico o diversos fenoles y flavonoides (Khan *et al.*, 2014).

Por todas estas propiedades nutricionales y farmacológicas, *Capsicum annuum* L. var. *annuum* se posiciona como un magnífico producto con potencial por explotar. Sin embargo, al igual que muchas otras especies de vegetales, el pimiento también se ve afectado por ciertas fitopatías que provocan una disminución de su valor biológico y económico. Entre las enfermedades más comunes que repercuten en la calidad y salubridad de *Capsicum annuum* se encuentra la “tristeza” del pimiento y la podredumbre gris. La tristeza del pimiento es causada por el oomiceto *Phytophthora capsici* y por el hongo *Verticillium dahlia* mientras que en la podredumbre gris el agente infectante es el hongo *Botrytis cinerea*. Ambas enfermedades pueden controlarse con fungicidas, pero en el campo se han observado cepas resistentes (Gayoso *et al.*, 2007; García *et al.*, 2018). Por ello, es importante buscar estrategias alternativas de control de patógenos que mejoren la defensa del pimiento y aumenten su rendimiento sin afectar al cultivo a largo plazo.

Extractos de ortiga (*Urtica dioica*)

La especie *Urtica dioica*, comúnmente conocida como ortiga, o estruga en Galicia (Figura 5), es una planta arbustiva, perenne y dioica que pertenece a la familia Urticaceae en el grupo principal de las Angiospermas (plantas con flores). Existen 46 especies del género *Urtica* siendo *Urtica dioica* L. la más común junto a *Urtica urens* (ortiga menor; Kregiel *et al.*, 2018). Esta planta es nativa de Europa, África, Asia y América del Norte y cuenta con un amplio grado de distribución por todo el planeta, prefiriendo aquellos climas tropicales templados (Kregiel *et al.*, 2018).

A pesar de que en muchas ocasiones se le considere una “mala hierba” siendo los tricomas urticantes su característica morfológica más distintiva, *Urtica* proviene del latín “uro” para quemar o “urere” para picar, son múltiples las referencias bibliográficas que describen a *Urtica dioica* como una fuente de compuestos medicinales y de ayuda frente a diversas dolencias (Joshi *et al.*, 2014; Fatima *et al.*, 2018, Kregiel *et al.*, 2018; Grauso *et al.*, 2020).

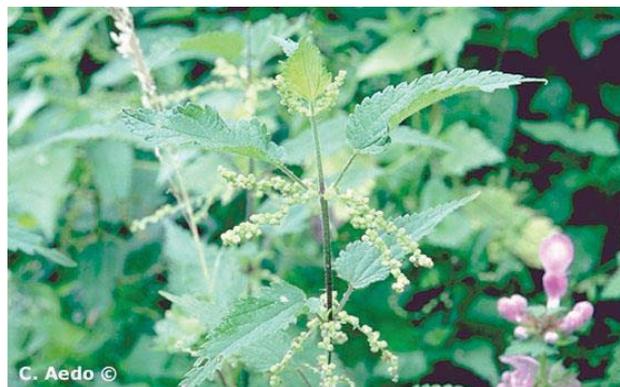


Figura 5. *Urtica dioica* (Aedo,1992)

Estas propiedades beneficiosas de la ortiga se ven igualmente reflejadas en su uso en el reino vegetal. Su composición en fitoesteroles, saponinas, flavonoides, taninos, esteroides o vitaminas entre otros compuestos, la convierten en un ideal antifúngico, insecticida y también en un potenciador del crecimiento vegetal (Ji *et al.*, 2007; Ortega *et al.*, 2009; Oliver *et al.*, 2018). A modo de ejemplo, en trabajos de Vega *et al.* (2015) y Puca (2016) se evaluaron los efectos de esta planta sobre la biomasa de la lechuga y la germinación de semillas de *Citrus x limón* Var. Rampur y se comprobó que el tratamiento con ortiga mejoraba ambos parámetros.

Para la aplicación de la ortiga como bioestimulante es conveniente obtener un extracto que facilite su manipulación y aplicación y optimice su efecto. Los métodos de extracción son variados y pueden realizarse a partir de plantas frescas, secas o fermentadas.

A los extractos obtenidos a partir de las ortigas fermentadas se les denomina purín. Los purines son sustancias producto del fermentado aeróbico de determinadas especies vegetales y suelen contener altas concentraciones de enzimas, aminoácidos y minerales. Su uso más habitual es como fertilizante, aplicado sobre la tierra o en riego ya que aumenta la diversidad y la disponibilidad de nutrientes para las plantas. El purín de ortiga destaca por su contenido en calcio, potasio y nitrógeno. Además, evita la clorosis al fomentar la síntesis de clorofila al poseer una elevada riqueza en Fe, elemento que promueve la formación de este pigmento (Irigoin y Espejo, 2015).

Por otro lado, están los extractos de ortiga no fermentados, conseguidos a partir de tratamientos de las hojas con disolventes orgánicos (etanol, hexano, diclorometano, acetona...) o agua. Este tipo de extractos, al igual que el purín, poseen gran cantidad de compuestos beneficiosos para las plantas. Además, dependiendo del solvente que se utilice, la composición de los extractos va a variar (Kukrić *et al.*, 2012; Azwanida, 2015).

Existen una amplia variedad de técnicas para conseguir estos extractos. Los métodos tradicionales como son la destilación, la extracción por soxhlet o la maceración en frío son los más empleados la investigación. Sin embargo, gracias a los nuevos avances en el procesamiento de plantas medicinales, encontramos nuevas prácticas como la extracción asistida por ultrasonidos (EAU) que también utilizan disolventes orgánicos, pero poseen mayor eficacia y menor coste que los métodos convencionales (Bandar *et al.*, 2013; Azwanida, 2015).

En los últimos años ha aumentado el interés por la agricultura ecológica. Cada vez son más los estudios que buscan en las plantas alternativas al uso de biocidas sintéticos (Garmendia *et al.*, 2018). La ortiga, como hemos comentado, cuenta tanto con cualidades medicinales como con una fácil producción, además de un bajo impacto ambiental, que hacen de ella una buena candidata para la creación de un fitofortificante del pimiento.

3. Hipótesis

Las plantas cuentan con diferentes mecanismos que le permiten hacer frente a patógenos u otras situaciones de estrés. El uso de elicitores puede promover la inducción de estos mecanismos de defensa y conseguir la resistencia a patógenos. Por otro lado, la experimentación *in vitro* en suspensiones celulares permite la reducción del espacio de trabajo y de los tiempos de crecimiento. La ortiga cuenta con cualidades medicinales así como una fácil producción, además de un bajo impacto ambiental, que hacen de ella una buena candidata para su uso como fitofortificante del pimiento. Por ello nos planteamos cómo hipótesis de trabajo de este proyecto, el uso de diferentes extractos de ortiga (*Urtica dioica*) como posibles elicitadores en suspensiones celulares de pimiento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*), estudiando para ello diferentes parámetros bioquímicos relacionados con el incremento de las defensas de la planta.

4. Objetivos

- Inicio de una línea celular de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* (pimiento) para obtener suspensiones celulares a partir de semillas.
- Obtención de *extractos de ortiga* (*Urtica dioica*) mediante diferentes metodologías (purín, maceración etanólica y maceración con ultrasonidos).
- Elicitación de las suspensiones celulares de pimiento con los diferentes extractos de ortiga y análisis de la respuesta de distintos parámetros: contenido de compuestos fenólicos totales, actividad peroxidasa y actividad antioxidante no enzimática y expresión de los genes *CaBPR1*, *CaSC1* y *CaPO1*.
- Identificar el extracto vegetal más idóneo para la elicitación de las suspensiones celulares de pimiento, que permita utilizarlo como inductor de defensas en plantas completas.

5. Metodología

Establecimiento del cultivo *in vitro*

Material biológico: plantas *in vitro*

Los ensayos se llevarán a cabo con *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, pimiento. El primer paso será la esterilización de semillas comerciales de pimiento para lo cual serán envueltas en gasas sujetas con un clip, sumergidas en agitación durante 2 minutos en etanol al 70 % y seguidamente en hipoclorito al 20 % durante 20 minutos.

Transcurridos los 20 minutos, las semillas serán trasladadas hasta una cabina de flujo laminar. Se lavarán 3 veces en agua destilada autoclavada para eliminar posibles restos de las soluciones de desinfección, a continuación se retirarán las semillas de la gasa con ayuda de un bisturí y unas pinzas y se dejarán secar en un papel de filtro durante aproximadamente 1 h. Por último, una vez secas, las semillas serán introducidas en frascos con medio de cultivo (Tabla 1). Estos frascos se sellarán con parafilm y se colocarán en una cámara de cultivo con un fotoperiodo 16 h de luz/8 h de oscuridad a una temperatura de 25 °C.

Inducción de callos y repicado

Una vez desarrolladas las plántulas de pimiento *in vitro*, se procederá a la inducción de callos a partir de aquellas que muestren un mejor estado fisiológico y sanitario, evitando las que tengan signos de clorosis, necrosis o un bajo crecimiento.

Todo el procedimiento se realizará en condiciones de esterilidad en la cámara de flujo laminar. En el primer paso se realizarán cortes tanto de los cotiledones de las plántulas como de sus tallos. Posteriormente los fragmentos resultantes se colocarán en una placa Petri con medio de cultivo sólido con hormonas (Tabla 1). Para el buen desarrollo de la técnica, los cortes de los cotiledones serán longitudinales y los de los tallos transversales, asegurando en todo momento el contacto de los meristemos apicales con el medio y con atención en que el envés de los cotiledones quede boca abajo. Por último, se sellarán las placas con parafilm y se colocarán en oscuridad y a temperatura ambiente durante 1 mes.

Durante este periodo las placas serán observadas en varias ocasiones para comprobar el estado de los callos. Cuando estos ya se encuentren desarrollados será el momento de elegir aquellos que tengan mejor aspecto (color blanquecino y textura blanda; Figura 6) y realizar un repicado para mantener el crecimiento del callo y crear reservas del material. Para ello, se extraerán parte de estos callos con un bisturí y pinzas y se colocarán en nuevas placas con el mismo medio y en las mismas condiciones.



Figura 6. Callos de pimiento desarrollados (Cortesía de la Dra. Ángeles Bernal)

Suspensiones celulares

A partir de los callos inducidos anteriormente, se procederá al inicio de las suspensiones celulares. Primeramente en la cabina de flujo y en condiciones de esterilidad, se seleccionarán las placas de Petri que contengan aquellos callos ideales; de aspecto blanquecino y textura blanda. A continuación, con ayuda de un bisturí y una pinza, se tomarán aproximadamente 8-10 gramos de callo y se depositarán en matraces de 100 mL junto a 40 mL de medio líquido con hormonas (Tabla 1). Los matraces se agitarán de manera manual para dispersar los callos y se colocarán en una cámara de cultivo a 24 °C, en oscuridad y con agitación continua en un agitador orbital.

Las suspensiones se revisarán periódicamente para comprobar el estado de las mismas. Cuando las suspensiones muestren síntomas de saturación (color más fuerte y mayor espesor o cerco; Figura 7), será necesario proceder a su subcultivo, realizando diluciones 1:2 en la cámara de flujo laminar y en condiciones de esterilidad. A cada matraz que se encuentre en condiciones de saturación se le añadirán 40 mL de medio de cultivo, se homogeneizará manualmente y su volumen será repartido a partes iguales en dos nuevos matraces de 100 mL cada uno. Por último, los matraces serán incubados en las mismas condiciones previas al subcultivo y observados periódicamente para la realización de más diluciones si fuese necesario.



Figura 7. Suspensión celular de pimiento saturada (Cortesía de la Dra. Ángeles Bernal)

Medios de cultivo

Para la elaboración de cada medio de cultivo se utilizará un matraz de 1 L de capacidad con 200 mL de agua destilada al que se le irán añadiendo los productos tal y como se describe en la Tabla 1.

Posteriormente a la introducción de los componentes, la solución tendrá que ser homogeneizada con la ayuda de un agitador magnético, se hará una cuantificación de la medida del pH que tendrá que oscilar los 5.8, valor que asegura un buen desarrollo vegetal, y finalmente se enrasará a 1L con agua destilada. Una vez elaborado 1 L de medio se dividirá a partes iguales en dos

botellas y ambas se introducirán en el autoclave para la esterilización a una temperatura aproximada de 121°C durante 15-20 min.

Tabla 1: Composición de los diferentes medios de cultivo

| MEDIO DE CULTIVO | | | |
|-----------------------------|------------------------|---------------|------------------------|
| | <i>In vitro plants</i> | Callos | Suspensiones celulares |
| PRODUCTO | CONCENTRACIÓN | CONCENTRACIÓN | CONCENTRACIÓN |
| Sales Murashige y Skoog | 4.406 g/L | 4.406 g/L | 4.406 g/L |
| Vitamina de Morel | 1 mL/L | 1 mL/L | 1 mL/L |
| Caseína | 250 mg/L | 250 mg/L | 250 mg/L |
| Sacarosa | 30 g/L | 30 g/L | 30 g/L |
| ác.2,4-diclorofenoxiacético | - | 3 mg/L | 3 mg/L |
| Kinetina | - | 0.05 mg/L | 0.05 mg/L |
| Agar | 8 g/L | 8 g/L | - |

Elicitación de las suspensiones celulares

Obtención de los extractos de Ortiga

Las partes aéreas de la ortiga, tanto hojas como tallos (evitando tallos leñosos) serán recolectadas de varios terrenos en la zona de Tabeaio, concello de Carral a principios de septiembre, evitando la época de floración.

Aquellos grupos de plantas que se vayan a someter a procesos de maceración o ultrasonidos con compuestos orgánicos, se lavarán con agua. Posteriormente se secarán a temperatura ambiente para después triturarlas con la ayuda de un mortero hasta conseguir un polvo homogéneo de ortiga. Este polvo se conservará hasta su posterior uso en recipientes de plástico a temperatura ambiente y evitando la luz solar. Las plantas destinadas a la obtención de purín no necesitarán ningún tratamiento previo.

Para la elaboración del purín, las partes aéreas recolectadas serán introducidas en bidones de plástico que se rellenarán con agua destilada en una relación de 1 kg de ortigas por 10 L de agua. A continuación, se removerá durante unos minutos favoreciendo la maceración del material y evitando la pudrición y se cerrará el bidón de forma no hermética, ya que la fermentación de este purín se realiza en presencia de oxígeno. Este procedimiento se repetirá cada dos días hasta que veamos que las burbujas, producto de la fermentación, hayan desaparecido.

A los 10-12 días del inicio del proceso, el purín estará listo y se procederá a su filtrado (mediante un colador de tela) y almacenado (botellas plásticas de volúmenes de 5 L) a temperatura ambiente y oscuridad hasta su utilización.

Para el segundo extracto, que se obtendrá por maceración con etanol, se mezclarán a temperatura ambiente y en un bote con tapa cerrado, 1g de polvo de ortiga con 50 mL de etanol absoluto. A las 24 h la mezcla se filtrará a través de un filtro de 0.45 μm . Por último, los extractos y almacenarán a -20 °C hasta su utilización (Bandar *et al.*, 2013).

Para el último método, la extracción por ultrasonidos, se colocarán en un matraz de 100 mL, 1 g de polvo de ortiga con 50 mL de etanol. A continuación se introducirá el matraz en el sistema de ultrasonidos, con una potencia de salida de 400 W, a una frecuencia de trabajo de 40 kHz durante 60 min a 50°C y sonicación con una duración del pulso de 5 s y un intervalo de descanso de 5 s. Finalmente, los extractos se almacenarán a -20°C hasta su utilización (Bandar *et al.*, 2013).

Preparación de suspensiones celulares para elicitación

El proceso se realizará en la cabina de flujo laminar a partir de suspensiones celulares de pimiento saturadas.

El primer paso será filtrar con un colador la suspensión saturada de forma que únicamente nos quedemos con la masa celular. Posteriormente, con ayuda de una espátula, presionaremos ligeramente la superficie del material vegetal, para eliminar mayor cantidad de medio líquido. Por último se pesarán 3 g de la masa celular y se introducirán en un Erlenmeyer de capacidad 100 mL junto a 20 mL de medio de cultivo líquido. Tendremos que conseguir un total de 12 matraces, 4 por extracto (Control 6 h, Control 24 h, Tratamiento 6 h, Tratamiento 24 h). Los matraces se mantendrán en una cámara con agitador orbital en oscuridad y a 25°C durante 24 h, momento en el que se lleve a cabo la elicitación. Se realizarán tres experimentos independientes para cada uno de los extractos de ortiga.

Elicitación de las suspensiones celulares

El proceso de elicitación se realizará en la cámara de flujo laminar. La elicitación consistirá en agregar 200 μL de elicitador (purín, extracto macerado con etanol o extracto por ultrasonidos) a cada matraz tratamiento (Tratamiento 6 h, Tratamiento 24 h) y 200 μL del solvente correspondiente (agua destinada o etanol) a los controles (Control 6 h, Control 24 h) tal y como se representa en la Figura 8.

Finalmente, las suspensiones celulares una vez elicidadas serán incubadas en las mismas condiciones, en la cámara de cultivo a 25 °C en oscuridad con agitación continua.

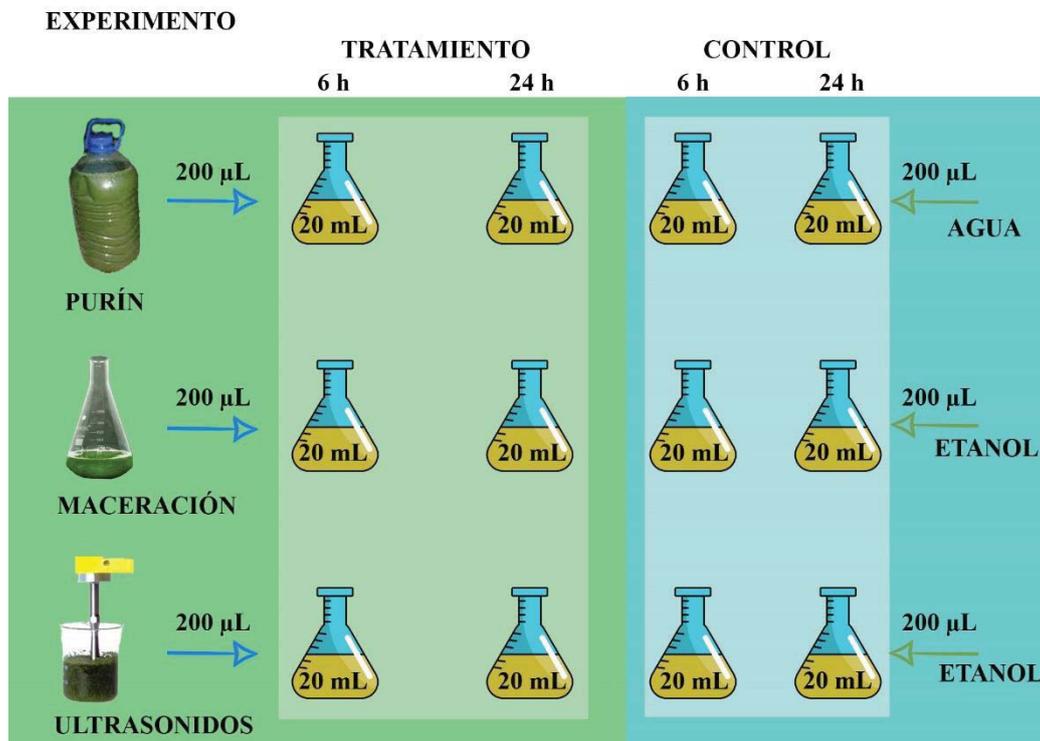


Figura 8. Representación del proceso de elicitación

Recogida y procesamiento de muestras

Una vez realizados los experimentos de elicitación se debe proceder a la recogida y procesamiento de muestras en la cabina de flujo laminar.

La recogida de las muestras de los matraces Tratamiento 6 h y Control 6 h se realizarán 6 h después de la elicitación y las muestras de los matraces Tratamiento 24 h y Control 24 h tendrá lugar 24 h después de la elicitación.

Se procederá de igual forma para todos los matraces, se filtrará su contenido haciendo uso de una bomba de vacío conectada a un kitasato provisto con un filtro en su boca superior que nos dará por un lado el material celular y por el otro el medio extracelular. Las muestras de células y de medio extracelular se guardarán en tubos de 10 mL y 50 mL y se conservarán en el congelador a -80 °C y -20 °C respectivamente. Los contenidos de todos los tubos serán previamente medidos obteniendo así los datos de masa de materia celular y de volumen del medio extracelular.

Para los futuros experimentos es necesario que las células se sometan a un proceso de rotura mecánica que permitirá acceder al contenido interior de las mismas. Cada muestra de células congeladas, será homogeneizada con la ayuda de un mortero en nitrógeno líquido de manera

que se evite la degradación de los diferentes componentes celulares. El material resultante se recogerá en varios tubos Eppendorf, se anotará en cada uno de ellos el peso de su contenido y seguidamente estos se congelarán mediante nitrógeno líquido y se conservarán a -80 °C.

Determinación del contenido total de fenoles y actividad antioxidante

Extracción de fenoles y sustancias antioxidantes del medio celular

Para la extracción de fenoles y antioxidantes del material vegetal será necesario resuspender el contenido de cada tubo. Para ello, el contenido de cada Eppendorf (0,5 g aproximadamente) se vaciará en un tubo de capacidad mayor (10 mL) y será resuspendido con 2.5 mL de metanol al 80%. Después de una incubación de 15 minutos a 70 °C se realizará una centrifugación de 10 minutos a 4000 r.p.m. El sobrenadante resultante se guardará en un tubo y el pellet se volverá a resuspender y a centrifugar del mismo modo. Por último, este sobrenadante se juntará con el de la primera centrifugación, se enrasará con metanol al 80 % a 10 mL y se almacenará en la nevera hasta su utilización.

Determinación del contenido total de fenoles

La medida del contenido en compuestos fenólicos se determinará siguiendo el método propuesto por Folin y Ciocalteu que hace uso de un reactivo a base de fosfomolibdato y fosfotungstato, reactivo Folin-Ciocalteu. En este caso el método estará ligeramente modificado para reducir la cantidad de reactivo según Slinkard y Singleton (1977) modificado por Kraujalyté *et al.* (2015).

Primeramente se elaborará una recta patrón a partir de la medida de absorbancia de concentraciones conocidas de un ácido fenólico, el ácido gálico (0.01, 0.02, 0.05, 0.1 y 0.2 mg de ácido gálico/mL). Las mediciones se llevarán a cabo mezclando 50 µL de cada una de las soluciones de concentración conocida de ácido gálico con 750 µL de agua destilada y 50 µL de solución de Folin-Ciocalteu (solución madre de Folin-Ciocalteu disuelta con agua en proporción 1:10). Tras una incubación de 3 min a temperatura ambiente se le añadirán 150 µL de Na₂CO₃ al 20 % y se volverá a incubar 2 h a temperatura ambiente para finalmente medir la absorbancia a 760 nm.

Finalmente para calcular la cantidad de fenoles presentes en las muestras elicidadas se seguirá el mismo procedimiento pero en vez de 50 µL de solución de ácido gálico se añadirán 50 µL de la muestra correspondiente. Los datos serán expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por miligramo de células. Cada una de las muestras se analizará por triplicado.

Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante no enzimática se evaluará mediante el método de Thaipong *et al.* (2006) de DPPH, basado en la determinación espectrofotométrica de la decoloración de un compuesto cromógeno oxidado en presencia de antioxidantes. El 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) es una molécula que en estado oxidado presenta un radical libre y una tonalidad violácea. Sin embargo, cuando se encuentra con un antioxidante, se reduce y su color se torna amarillento. A mayor capacidad antioxidante del extracto, la pérdida de color será mayor y proporcional al grado de captura del radical oxidado. El cambio de color se ve reflejado en la absorbancia por lo que se puede calcular el porcentaje de DPPH que se ha reducido según la siguiente fórmula.

$$\% \text{ DPPH reducido} = ((A_0 - A_m) / A_0) 100$$

A₀ = absorbancia de la dilución madre

A_m = absorbancia de la muestra

Antes de la determinación de la actividad antioxidante de las muestras elicidadas, es necesario una recta de calibrado con Trolox, un antioxidante análogo a la vitamina E, a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40, 50, 100 y 200 μM .). Para ello primeramente se elabora a partir de una dilución madre de DPPH 1mM (40 mg de DPPH en 100 mL de metanol absoluto) una dilución, que medida a 525 nm, tenga un valor de absorbancia de 0.800 usando como blanco el metanol absoluto. A continuación, se tomarán 950 μL de esta disolución y se mezclarán en una cubeta con 50 μL de cada una de las diluciones a diferentes concentraciones de Trolox (para cada concentración se realizarán tres réplicas). Se medirá la absorbancia a 525 nm y con los datos obtenidos se realizará una recta de calibrado. Por último para obtener las absorbancias de las muestras elicidadas, se seguirá el mismo procedimiento, substituyendo los 50 μL de Trolox por 50 μL de cada muestra.

La capacidad antioxidante se expresará en μmol de equivalentes de Trolox/g de muestra.

Extracción de proteínas totales

Este procedimiento se realizará mediante la mezcla de cada una de las muestras destinadas a la extracción de proteínas (0.5 g aproximadamente) con 2 mL de tampón Tris HCl 50 mM + KCl 1M pH= 7.5 y 25 mg PVPP (polivinilpolipirrolidona). La mezcla resultante se centrifugará a 4 °C 20 minutos a 10000 r.p.m. para obtener el sobrenadante. Posteriormente, los sobrenadantes se pasarán a tubos graduados para apuntar su volumen, y se enrasarán a 2.5 mL con tampón Tris HCL 50 mM pH=7.5.

Por último, el contenido de cada tubo se desalará con una columna PD-10 (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante. El volumen de elución de cada muestra (3.5 mL) será separado en dos Eppendorf, uno para la determinación de proteínas totales y otro para la cuantificación de la actividad de la peroxidasa, y conservados a -80 °C hasta su utilización.

Determinación del contenido total de proteínas

La cuantificación de proteínas totales se hará mediante el método de Stoscheck (1990). Primeramente, se descongelarán las muestras preparadas en el proceso de extracción de proteínas totales y se centrifugarán a 13000 r.p.m. durante 1 minuto. A continuación, se mezclan en un tubo Eppendorf, 900 µL de reactivo de Bradford, 50 µl de NaOH 1 M, 10 µL de muestra (para el blanco 10 µL de agua destilada) y 40 µL de agua destilada y se incuban en oscuridad 5 minutos para que se produzca la reacción. Una vez finalizada la incubación, se medirá la absorbancia de cada muestra a 590 nm. La recta de calibrado se realizará utilizando soluciones patrón de seralbúmina bovina a concentración conocida. Los resultados se expresarán en mg de proteína/g muestra.

Determinación de la actividad peroxidasa

La actividad de la peroxidasa se evaluará mediante un ensayo colorimétrico en el que se medirá el descenso del valor de la absorbancia a causa de la oxidación de un compuesto donador de electrones, el 4-metoxinaftol. Para la mezcla de reacción se utilizarán; 930 µL de Tris HCl 50 mM pH=7.5 a 25 °C, 10 µL de 4 metoxinaftol (100 mM), 10 µL de muestra (en el caso del blanco se sustituirán por 10 µL de Tris HCl) y 50 µL de H₂O₂ (10 mM)

Se agitará la cubeta e inmediatamente se medirá la absorbancia inicial a 593 nm (t= 0 min). Se dejará el tubo dentro del espectrofotómetro y se realizarán lecturas sucesivas a lo largo de 3 min. Se realizarán 3 réplicas de cada muestra.

Por último, para conocer la actividad enzimática se calcularán las unidades de actividad enzimática (U) en 1 mL de extracto. Una unidad (U) hace referencia a la cantidad de enzima necesaria para la conversión de 1 µmol de sustrato en producto(s) en 1 minuto de reacción.

$$U/mL = \mu\text{mol}/\text{minmL}$$

$$U/mL = \left(\frac{\Delta\text{Abs}/\text{min}}{\epsilon b} \right) DF1 \cdot 1000$$

$\Delta\text{Abs}/\text{min}$ = incremento de la absorbancia en el tiempo

ϵ = coeficiente de extinción molar = $21.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b = paso óptico, anchura de la celda que contiene la muestra (cm)

$DF1$ = factor de dilución correspondiente al Volumen total/ Volumen del extracto

Finalmente la actividad de la peroxidasa se expresará en unidades de actividad enzimática (U) por mg de proteína (actividad específica) utilizando los datos resultantes de la determinación de proteínas totales.

Determinación de la expresión de genes

Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizará utilizando el E.Z.N.A.® Plant RNA Kit, siguiendo el protocolo para muestras difíciles indicado por el fabricante, que incluye un mayor número de fases de lisado. Este kit utiliza columnas de afinidad que consiguen una extracción y purificación de las muestras óptimas para los siguientes ensayos. Además, también cuenta con un *buffer* de lisado que facilita el tratamiento de extracción y de eliminación de posibles sustancias contaminantes como polisacáridos o compuestos fenólicos. Las muestras de ARN se congelarán con nitrógeno líquido y se almacenarán a -80 °C.

Antes de proceder con el siguiente paso es recomendable hacer un control para comprobar que la cantidad de ARN en las muestras es suficiente. Para ello se determinará la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm. El valor de absorbancia a 260 nm nos proporcionará la concentración de ARN, mientras que la ratio 260/280 indicará su calidad y pureza.

Síntesis de cDNA

Una vez obtenido el ARN de las muestras elicidadas de pimiento, es necesario someterlas a un proceso de retrotranscripción que permitirá la síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir de ARNm. Para ello se hará uso del kit iScript™ cDNA Synthesis Kit de BIO RAD siguiendo el protocolo indicado por el fabricante para la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

PCR en tiempo real

Para finalizar el análisis de la expresión de los genes *CaBPRI* (gen de una proteína PR1), *CaSCI* (sesquiterpeno ciclasa) y *CaPOI* (gen de peroxidasa del pimiento) cada una de las muestras de cDNA será sometida a una PCR en tiempo real (qPCR) utilizando un Biorad iCycle™iQ System.

La PCR en tiempo real, a diferencia de la convencional, no solo permite la amplificación del ADN sino que también posibilita su detección en un único paso gracias al uso de fluoróforos, cuanto mayor sea la intensidad fluorescente mayor será la concentración de producto de reacción.

La qPCR será realizada por el personal de la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo a Investigación de la UDC (SAI) con los cebadores indicados en la Tabla 2. La PCR constará de 3 etapas; desnaturalización (2 minutos a 95 °C), amplificación (40 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 25 segundos a 58 °C y 50 segundos a 72 °C) y extensión final (5 minutos a 72 °C).

Tabla 2: Cebadores empleados en el estudio mediante PCR en tiempo real

| GEN | Nº ACCESO | FUENTE | NOMBRE | SECUENCIA | AMPLICÓN |
|---------------|-----------|-------------------------------|---------|-------------------------------|----------|
| <i>CaBPR1</i> | AF053343 | (Gayoso <i>et al.</i> , 2007) | PR1Fw | 5'GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT3' | 301 pb |
| | | | PR1Rv | 5'CAAGCAATTATTTAAAGATCCA3' | |
| <i>CaSCI</i> | AF061285 | (Silvar <i>et al.</i> , 2008) | CaSCFW | 5'GCCTCCTGCTTCTGAATACC3' | 312 pb |
| | | | CaSCRv | 5'TTAATATCCTTCCATCCCGACT3 | |
| <i>CaPO1</i> | AF442386 | (Garcia <i>et al.</i> , 2015) | CAPXFW | 5' ACACTGGAAGCGTGAACAAT 3' | 333 pb |
| | | | CAPXRv | 5' CAGCTTGCCTAACATGAAC 3' | |
| <i>CaACT</i> | AY572427 | (Silvar <i>et al.</i> , 2008) | CaACTFw | 5'ATCCCTCCACCTCTTCACTCTC3 | 128 pb |
| | | | CaACTRv | 5'GCCTTAACCATTCTGTTCCATTATC3' | |

A partir de los datos que obtendrá el SAI, se procederá al cálculo de la expresión génica mediante la cuantificación relativa de los genes de interés en comparación al gen de referencia, que en este caso será el gen de la actina (*CaACT*). Para obtener la ratio de expresión relativa de cada gen respecto al gen de referencia será necesario calcular la eficiencia (E) para cada gen y cada muestra, y conocer el umbral de ciclo (Ct), ciclo de PCR en el que la intensidad de fluorescencia de la reacción supera un umbral establecido (Figura 9).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{diana}})^{\Delta C_{\text{tdiana}} (\text{control - muestra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{tref}} (\text{control - muestra})}}$$

$$E = (10^{-\frac{1}{K}}) - 1$$

K (pendiente de la recta de eficiencia)

Figura 9. Ecuaciones para el cálculo de expresión génica

Los resultados se obtendrán en base a la fórmula anterior y se expresarán relativizando a su respectivo control.

Análisis estadístico

Todos se los experimentos se realizarán al menos por triplicado. Además, en todos los casos se hará un análisis estadístico para ver si existen diferencias significativas debidas a los tratamientos. El tipo de análisis se decidirá en función de la distribución y variabilidad de los datos.

6. Plan de trabajo

Las diferentes actividades que se describen en el trabajo han sido planeadas para ser realizadas por una sola persona durante un curso académico. Concretamente se han seguido los plazos estipulados para la entrega y defensa de un TFM (Tabla 3).

Tabla 3. Diagrama de Gantt

| TAREAS | MESES | | | | | | | | | | |
|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| TRABAJO EXPERIMENTAL | | | | | | | | | | | |
| Cultivo de semillas y crecimiento de plantas | █ | | | | | | | | | | |
| Inducción de callos y repicados | █ | █ | | | | | | | | | |
| Suspensiones celulares | | | █ | █ | | | | | | | |
| Obtención de extractos vegetales | | | █ | █ | | | | | | | |
| Elicitación de las suspensiones celulares | | | | █ | █ | | | | | | |
| Determinación del contenido total de fenoles y actividad antioxidante | | | | | █ | █ | | | | | |
| Determinación de la expresión de genes | | | | | | █ | █ | | | | |
| CONCLUSIONES | | | | | | | | | | | |
| Análisis e interpretación de resultados | | | | | | | █ | █ | | | |
| Redacción de conclusiones | | | | | | | █ | █ | | | |
| DIFUSIÓN DE RESULTADOS | | | | | | | | | | | |
| Publicación del estudio | | | | | | | | | | █ | █ |
| Participación en congresos y jornadas | | | | | | | | | | █ | █ |

7. Cuestiones éticas

El desarrollo de esta investigación no implicará el uso de ningún sujeto animal y/o humano ni tampoco la utilización de datos personales que vulneren la privacidad de estos últimos. Además, el material vegetal empleado no procede de países en desarrollo ni pertenece a especies en peligro de extinción.

Respecto a la ética medioambiental, todos los residuos, tanto los contaminantes como aquellos inocuos para el ecosistema y la salud, serán debidamente almacenados para su posterior tratamiento y eliminación.

Por todo ello, este proyecto cumple con los principios éticos y normas legales relativas a la investigación.

8. Aplicabilidad

Previo a la explicación de la aplicabilidad es necesario comentar que los extractos que muestren una mayor inducción de resistencia en suspensiones celulares de pimiento, han de ser probados en campo con plantas completas y en tratamientos con patógenos.

La puesta en marcha del presente proyecto y el cumplimiento de los objetivos expuestos al principio del trabajo permitirán, principalmente, el desarrollo de los siguientes procesos.

Por una parte, el diseño de un protocolo de cultivo de suspensiones *in vitro*, permite seleccionar de forma rápida cuales son los mejores candidatos como elicitores.

Por otra parte, un protocolo que aumente la resistencia del pimiento, puede ser de gran importancia para el desarrollo de un producto fitosanitario, que mejore la resistencia del pimiento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) a diferentes patógenos o a múltiples condiciones de estrés.

Finalmente, la elevada producción de sustancias antioxidantes, puede ser utilizada por numerosas industrias como la cosmética o la farmacéutica para el desarrollo de productos con propiedades antioxidantes para el ser humano.

9. Plan para la difusión de los resultados

Una vez finalizado el proyecto y redactados los resultados y conclusiones, estos se publicarán en una revista del ámbito fitológico como la revista Plant Pathology (factor de impacto: 2.169 Q1 en “Agronomy” según Journal Citation Reports (JCR)) o Plant Biology (factor de impacto: 2.167).

Además, se solicitará la participación en diferentes congresos y jornadas organizadas por la Sociedad Española de Fitopatología, así como en el congreso Nacional de la Sociedad Española

de Biotecnología. De no realizarse de manera presencial, se gestionará la posibilidad de participar de forma digital en el mismo o en otros que presenten esta modalidad.

Para estos eventos se realizarán previamente documentos gráficos en los que se reflejen los resultados obtenidos.

10. Recursos necesarios

Para la realización de este proyecto y cumplimiento de sus objetivos se necesita de ciertas infraestructuras y recursos.

Recursos disponibles en el laboratorio

| RECURSOS DISPONIBLES EN EL LABORATORIO | - |
|---|----------|
| Cámaras De Cultivo | Lab |
| Erlenmeyers 100 mL | Lab |
| Cabina Flujo | Lab |
| Congelador | Lab |
| Nevera | Lab |
| Autoclave | Lab |
| Espectrofotómetro | Lab |
| Sistema ultrasonidos | Lab |
| Centrifuga | Lab |
| Baño | Lab |
| Báscula | Lab |
| Mortero | Lab |
| Ph-metro | Lab |
| Pinzas | Lab |
| Espátula | Lab |
| Bisturí | Lab |
| Varilla de vidrio | Lab |
| Pastilla magnética | Lab |
| Probetas de varios volúmenes | Lab |
| Botellas de vidrio | Lab |
| Vasos de precipitados de varios volúmenes | Lab |
| Matraces de varios tamaños | Lab |
| Frasco medio de cultivo | Lab |
| Tubos diferentes volúmenes | Lab |
| Tubos centrifuga | Lab |
| Micropipetas varios volúmenes | Lab |
| Bandejas | Lab |
| Agua destilada | Lab |

Recursos y servicios a adquirir

| RECURSOS Y SERVICIOS A ADQUIRIR | COSTE (€) |
|--|-----------|
| Bidones | 38.2 |
| Baño de ultrasonidos | 388 |
| Placas Petri | 163.35 |
| Cubetas espectrofotómetro | 22 |
| Tubos Eppendorf 1.5 y 2 mL | 45 |
| Puntas de micropipetas de varios volúmenes | 92.94 |
| Gasas | 27 |
| Papel Filtro | 39.67 |
| Filtro 0.45 micras | 210.6 |
| Papel aluminio | 28 |
| Parafilm | 46.6 |
| Bolsas autoclave | 43 |
| Guantes | 23 |
| Semillas pimiento | 2.6 |
| Columnas PD-10 (GE Healthcare) | 327 |
| Sales Murashige y Skoog | 206 |
| Vitamina De Morel | 73 |
| Caseína | 121.2 |
| Sacarosa | 45.6 |
| Ác.2,4-Diclorofenoxiacético | 36.4 |
| Kinetina | 55.66 |
| Agar | 156 |
| Etanol | 23.3 |
| Hipoclorito | 1 |
| Metanol absoluto | 24 |
| Reactivo Folin Ciocalteu | 51 |
| Ácido gálico | 71.4 |
| Na ₂ CO ₃ al 20% | 32 |
| PVPP (polivinilpolipirrolidona) | 65 |
| NAOH 1M | 17.3 |
| Reactivo de Bradford | 65 |
| Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) | 22.5 |
| Albúmina sérica bovina | 202 |
| 4 metoxinaftol | 95.6 |
| HCl | 8 |
| Tris | 44.3 |
| Trolox | 51 |
| E.Z.N.A. ® Plant RNA Kit | 185 |

| | |
|---|----------------|
| Kit Iscripttm Cdna Synthesis Kit De BIO RAD | 420 |
| Cebadores de cada gen | 57.8 |
| Servicios externos | € |
| qPCR (SAI) | 1780 |
| PRESUPUESTO TOTAL | 5047.02 |

11. Bibliografía

Abdelnour-Esquivel, A., y Vincent, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. CATIE. México.

Aedo, C. (1992). *Flora Ibérica*. <http://www.floraiberica.org/> [Visitado por última vez 20/11/2020]

Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(196), 2167-0412.

Ballester, A. (2007). Historia del cultivo *in vitro* en España. Publicado en el Libro de resúmenes de la VII Reunión de la SECIVTV (Alcalá de Henares, 25-27 Junio 2007). Editores: M. Toribio, M.C. Sánchez, J.M. González, J. Alegre.

Bandar, H., Hijazi, A., Rammal, H., Hachem, A., Saad, Z., y Badran, B. (2013). Techniques for the extraction of bioactive compounds from Lebanese *Urtica Dioica*. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 1(6), 507-513.

Bielza, P., Moreno, I., Belando, A., Grávalos, C., Izquierdo, J., y Nauen, R. (2019). Spiromesifen and spirotetramat resistance in field populations of *Bemisia tabaci* Gennadius in Spain. *Pest Management Science*, 75(1), 45-52.

Carvalho, I. S., Cavaco, T., y Brodelius, M. (2011). Phenolic composition and antioxidant capacity of six artemisia species. *Industrial Crops And Products*, 33(2), 382-388.

Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., y Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics And Molecular Biology*, 35(4), 1011-1019.

Chinou, I. (2008). Primary and secondary metabolites and their biological activity. En M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, y T. Kowalska. (Ed.), *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry (chromatographic science series vol. 99; pp. 59-76)*. CRC Press. EEUU.

Delaunois, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., y Cordelier, S. (2014). Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7), 4837-4846.

Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., y García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18.

- Estrada, B., Bernal, M. A., Díaz, J., Pomar, F., y Merino, F. (2000). Fruit development in *Capsicum annuum*: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6234-6239.
- Fatima, T., Naseer, B., y Hussain, S. Z. (2018). Stinging Nettle: A herb with tremendous pharmacological potential. *International Journal of Unani and Integrative Medicine*, 2(2), 24-28.
- García, T., Gutiérrez, J., Veloso, J., Gago-Fuentes, R., y Díaz, J. (2015). Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. *Journal of Plant Physiology*, 176, 202-209.
- García, T., Veloso, J., y Díaz, J. (2018). Vanillyl nonanoate induces systemic resistance and lignification in pepper plants. *Journal Of Plant Physiology*, 231, 251-260.
- Garmendia, A., Raigón, M. D., Marques, O., Ferriol, M., Royo, J., y Merle, H. (2018). Effects of nettle slurry (*Urtica dioica* L.) used as foliar fertilizer on potato (*Solanum tuberosum* L.) yield and plant growth. *PeerJ*, 6, e4729.
- Gayoso, C., Martínez de Ilarduya, O., Pomar, F., y Merino, F. (2007). Assessment of real-timePCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahlia* in different *Solanaceae* cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 199-209.
- Giannakopoulou, A., Schornack, S., Bozkurt, T. O., Haart, D., Ro, D. K., Faraldos, J. A., ... y O'Maille, P. E. (2014). Variation in capsidiol sensitivity between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora capsici* is consistent with their host range. *PLoS One*, 9(9), e107462.
- Grauso, L., de Falco, B., Lanzotti, V., y Motti, R. (2020). Stinging nettle, *Urtica dioica* L.: botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 19, 1341-1377.
- González Minero, F. J., y Bravo Díaz, L. (2017). Historia y actualidad de productos para la piel, cosméticos y fragancias. Especialmente los derivados de las plantas. *Ars Pharmaceutica*, 58(1), 5-12.
- Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J. A., Apone, F., Abdel-Salam, E. M., Qahtan, A. A., ... y Siddiqui, K. S. (2018). Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. *Genes*, 9(6), 309.
- Hasanuzzaman, M., Fotopoulos, V., Nahar, K., y Fujita, M. (Eds.). (2019). *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*. John Wiley & Sons. Nueva Jersey, EEUU.

Henry, G., Thonart, P., y Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 16(2), 257-268.

Hoagland, D. R., y Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station*, 347, 32..

Hoagland, D. R., y Snyder, W. C. (1933). Nutrition of strawberry plant under controlled conditions:(a) effects of deficiencies of boron and certain other elements:(b) susceptibility to injury from sodium salts. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* , 30, 288-294.

Hong, J. K., Lee, S. C., y Hwang, B. K. (2005). Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. *Gene*, 356, 169-180.

Ismail, F., Anjum, M. R., Mamon, A. N., y Kazi, T. G. (2011). Trace metal contents of vegetables and fruits of Hyderabad retail market. *Pakistan Journal Of Nutrition*, 10(4), 365-372.

Irigoin, L. C., y Espejo, M. R. (2015). Efecto del purín de hojas de ortiga, *Urtica dioica*, sobre el crecimiento del rabanito, *Raphanus sativus*, en condiciones de laboratorio. *Revista Rebiolest*, 2(2), 33-42.

Ji, T. F., Liu, C. H., Wang, A. G., Yang, J. B., Su, Y. L., Yuan, L., y Feng, X. Z. (2007). Studies on the chemical constituents of *Urtica dioica* L. grown in Tibet Autonomous Region. *Zhongyaocai = Journal Of Chinese Medicinal Materials*, 30(6), 662-664.

Joshi, B. C., Mukhija, M., y Kalia, A. N. (2014). Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. *International Journal of Green Pharmacy*, 8(4), 201-209.

Kamle, M., Borah, R., Bora, H., Jaiswal, A. K., Singh, R. K., y Kumar, P. (2020). Systemic Acquired Resistance (SAR) and Induced Systemic Resistance (ISR): role and mechanism of action against phytopathogens. En A. L. Hesham, R. Upadhyay, G. Sharma, C. Manoharachary, V. Gupta. (Eds.), *Fungal Biotechnology and Bioengineering* (pp. 457-470). Springer. Berlín, Alemania.

Khan, F. A., Mahmood, T., Ali, M., Saeed, A., y Maalik, A. (2014). Pharmacological importance of an ethnobotanical plant: *Capsicum annum* L. *Natural Product Research*, 28(16), 1267-1274.

Kraujalytė, V., Venskutonis, P. R., Pukalskas, A., Česonienė, L., y Daubaras, R. (2015). Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*, 188, 583-590.

Kregiel, D., Pawlikowska, E., y Antolak, H. (2018). *Urtica* spp.: Ordinary plants with extraordinary properties. *Molecules*, 23(7), 1664.

Knudsen, C., Gallage, N. J., Hansen, C. C., Møller, B. L., y Laursen, T. (2018). Dynamic metabolic solutions to the sessile life style of plants. *Natural Product Reports*, 35(11), 1140-1155.

Kukrić, Z. Z., Topalić-Trivunović, L. N., Kukavica, B. M., Matoš, S. B., Pavičić, S. S., Boroja, M. M., y Savić, A. V. (2012). Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Periodica Technologica*, 43, 257-272.

Le Goff, G., y Giraudo, M. (2019). Effects of pesticides on the environment and insecticide resistance. En J. F. Picimbon. (Ed.), *Olfactory Concepts of Insect Control-Alternative to Insecticides* (pp. 51-78). Springer. Berlín, Alemania.

Liu, H., Kang, Y., Zhao, X., Liu, Y., Zhang, X., y Zhang, S. (2019). Effects of elicitation on bioactive compounds and biological activities of sprouts. *Journal of Functional Foods*, 53, 136-145.

Macho, A. P., y Lozano-Duran, R. (2019). Molecular dialogues between viruses and receptor-like kinases in plants. *Molecular Plant Pathology*, 20(9), 1191-1195.

Martín Gordo, D. A. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81 - 104.

Mhamdi, A., y Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 145(15), dev164376.

Morales-Rubio, M.E., Espinosa-Leal, C., y Garza-Padrón, R.A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. En C. Rivas Morales, M. A. Oranday-Cardenas, y M. J. Verde-Star. (Eds.), *Investigación en Plantas de Importancia Médica* (pp. 351-410). OmniaScience. Barcelona, España.

Moscatiello, R., Baldan, B., y Navazio, L. (2013). Plant cell suspension cultures. En F. Maathius. (Ed), *Plant Mineral Nutrients* (pp. 77-93). Humana Press. Totowa, New Jersey.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497

Nollet, L. y Gutierrez-Urbe, J. (Eds.). (2018). *Phenolic Compounds In Food*. CRC Press. Boca Raton, Florida.

Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144, 31-43.

Oliver, M., Cavigioli, J. P., Marasas, M. E., Simontacchi, M., y Maydup, M. L. (2018). Efecto de un fermentado vegetal de ortiga sobre el crecimiento de lechuga. *Investigación Joven*, 4(2), 71.

Ortega, R. N., Alban, R., y Alfonzo, D. (2009). Los purines a base de ortiga (*Urtica dioica*) una alternativa natural en el control de insectos del orden Coleoptera. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 4(2).

Paes, J. D. S., de Araújo, T. A., Ramos, R. S., Soares, J. R. S., de Araújo, V. C., y Picanço, M. C. (2019). Economic injury level for sequential sampling plan of *Frankliniella schultzei* in bell pepper crops. *Crop Protection*, 123, 30-35.

Pereira-Dias, L., Vilanova, S., Fita, A., Prohens, J., y Rodríguez-Burruezo, A. (2019). Genetic diversity, population structure, and relationships in a collection of pepper (*Capsicum* spp.) landraces from the Spanish centre of diversity revealed by genotyping-by-sequencing (GBS). *Horticulture research*, 6(1), 54.

Puca, F. (2016). *Evaluación de bioestimulantes orgánicos como alternativa ecológica para accionar la germinación de semillas de Citrus x limón Variedad Rampur, en el cantón Ambato, parroquia Izamba*. (Trabajo de máster). Magister, Cevallos (Ecuador).

Reche, J. (2010). *Cultivo Del Pimiento Dulce En Invernadero*. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla.

Reglamento del Consejo (EC) No 510/2006 'Pemento de Herbón' EC No: ES-PDO-0005-0509-15.11.2005 (2009). Official Journal of the European Union. Pages C 308/51-C 308/56.

Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., y Verde-Star, M. J. (Eds.). (2016). *Investigación en Plantas de Importancia Médica (Spanish Edition)*. OmniaScience. Barcelona ,España.

Sharma, P. (2004). *Plant Pathology*. Rastagori Publication. New Delhi, India.

Sharry, E., Adema, M., y Abedini, W. (Coords.). (2015). *Plantas de Probeta*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). La Plata, Argentina.

Silvar, C., Merino, F., y Díaz, J. (2008). Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, 165(10), 1120-1124.

Singh, R., y Chandrawat, K. S. (2017). Role of phytoalexins in plant disease resistance. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 125-129.

Slinkard, K., y Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.

Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182, 50-68.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., y Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Compostion and Analysis*, 19(6-7), 669-675.

Tripathi, S., y Mishra, N. (2009). Nutritional changes in powdered red pepper upon *in vitro* infection of *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 139-144.

Valares, C. (2011). *Variación Del Metabolismo Secundario En Plantas Debida Al Genotipo Y Al Ambiente*. (Tesis doctoral) Universidad de Extremadura, Badajoz, España.

Vega, D., Garzón, M., Niño, S., y Rico, P. (2015). Bioestimulante para la producción de lechuga. *Lactuca sativa* L. *INVENTUM*, 10(19), 13-20.

Venero Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.

Vicuna, D. (2005). *The Role of Peroxidases in the Development of Plants and Their Responses to Abiotic Stresses*. (Tesis doctoral). Technological University Dublin, Dublín, Irlanda.

Zhao, S., y Blumwald, E. (1998). Changes in oxidation-reduction state and antioxidant enzymes in the roots of jack pine seedlings during cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 104(1), 134-142.