



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

División de Investigación y posgrado

**MANEJO DE LA HORMESIS DEL PIMIENTO  
(*Capsicum annuum* sbp *grossum*) PARA MEJORAR  
SU POTENCIAL DE XENOHORMESIS**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**DOCTOR EN INGENIERÍA**

PRESENTA:

**M. C. Marcela Vargas Hernández**

DIRIGIDA POR:

**Dr. Irineo Torres Pacheco**

C.U. Santiago de Querétaro, Noviembre 2017.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Doctorado en Ingeniería

**MANEJO DE LA HORMESIS EN PIMIENTO (*Capsicum  
annuum sbp grossum*) PARA MEJORAR SU POTENCIAL DE  
XENOHORMESIS**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Doctor en Ingeniería.

**Presenta:**

M. C. Marcela Vargas Hernández

**Dirigida por:**

Dr. Irineo Torres Pacheco

SINODALES

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Presidente

Firma

Dr. Ramón Guevara González  
Secretario

Firma

Dra. Rosalía V. Ocampo Velázquez  
Vocal

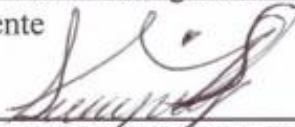
Firma

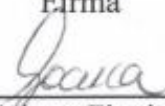
Dr. Rufino Nava Mendoza  
Suplente

Firma

Dr. Juvenal Rodríguez Reséndiz  
Suplente

Firma

  
Dr. Aurelio Domínguez González  
Director de la Facultad

  
Dra Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre 2017

## Resumen

En esta investigación se pretende determinar las curvas de hormesis para establecer los límites de respuesta adaptativa en términos de productos finales del metabolismo de defensa y posteriormente identificar cuáles de esos productos finales del metabolismo de defensa pueden funcionar además como nutraceuticos confiriendo al alimento el carácter funcional y mejorando así su potencial xenohormico.

Para lo anterior se va a determinar de manera colorimétrica la cantidad de metabolitos secundarios de los chiles pimientos bajo el efecto de elicitores de origen biótico en precosecha como son fenoles, flavonoides y taninos. Por otro lado, se va a medir la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos para determinar su potencial de xenohormesis. Los resultados sugieren que los diferentes tratamientos inducen la producción de fenoles, flavonoides y taninos además de la capacidad antioxidante de sus extractos. Por otro lado, en algunos tratamientos se muestran curvas tipo hormesis lo que confirma el manejo de la hormesis por efecto de elicitores bióticos que no son tóxicos.

**Palabras clave:** Hormesis, xenohormesis, elicitores bióticos, nutraceuticos.

## SUMMARY

This research aims to determine the hormesis curves to establish the limits of adaptive response in terms of end products of defense metabolism and subsequently identify which of those end products of defense metabolism can also function as nutraceuticals conferring on the food the functional and improving its xenohormic potential.

For the above, the amount of secondary metabolites of peppers chilies under the effect of elicitors of biotic origin in pre-harvest, such as phenols, flavonoids and tannins was determined colorimetrically. On the other hand, the antioxidant capacity of methanolic extracts will be measured to determine their xenohormesis potential. The results suggest that the different treatments induce the production of phenols, flavonoids and tannins in addition to the antioxidant capacity of their extracts. On the other hand, in some treatments are shown curves type hormesis which confirms the management of the hormesis by the effect of biotic acoustics that are not

**Key words:** Hormesis, xenohormesis, biotic elicitor, nutraceuticals.

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>i</b>
<b>Summary</b>	<b>ii</b>
<b>Índice general</b>	<b>iii</b>
<b>Índice cuadros</b>	<b>vi</b>
<b>Índice figuras</b>	<b>vii</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Justificación.....	5
1.4 Hipótesis.....	6
1.5 Objetivos.....	7
1.5.1 Objetivo general.....	7
1.5.2 Objetivos particulares.....	7
1.6 Contenido de la tesis.....	8
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>9</b>
2.1 Hormesis en las plantas.....	9
2.2 Reconocimiento de la planta y sus mecanismos de defensa.....	12
2.3 Priming en las plantas.....	14
2.4 Elicitores bióticos como inductores en plantas.....	15
2.4.1 Especies Reactivas de Oxígeno.....	16

2.4.2 Organismos fitopatógenos.....	17
2.4.3 Organismos benéficos.....	20
2.4.2 Comunicación planta-planta.....	22
2.4.3 DNA homólogo.....	24
2.5 Xenohormesis.....	25
2.6 Principales grupos de investigación.....	29
<b>III. MÉTODOLOGÍA</b>	<b>30</b>
3.1 Material.....	27
3.1.1 Material Químico.....	27
3.1.2 Material Biológico.....	27
3.2 Determinación de los métodos adecuados para la obtención de elicitores bióticos bióticos.....	31
3.2.1 Preparación de elicitores bióticos a base de hongos.....	31
3.2.2 Preparación de elicitores bióticos a base de bacterias.....	31
3.2.3 Extracción y fragmentación de ADN.....	32
3.2.4 Preparación de extractos de plantas.....	33
3.3 Determinación del incremento de la hormesis en <i>Capsicum annuum</i> al aplicar los elicitores bióticos en precosecha .....	34
3.3.1 Establecimiento del cultivo .....	34
3.3.2 Diseño de experimentos.....	34
3.3.2 Elaboración de los extractos metanólicos.....	35
3.3.4 Análisis del contenido de fenoles totales.....	36
3.3.5 Análisis del contenido de flavonoides.....	36
3.3.6 Análisis del contenido de taninos condensados.....	37

3.3.7 Perfil metabolómico.....	37
3.3.8 Elaboración de microarreglos para la identificación del perfil de expresión de transcritos.....	37
3.4 Determinación del potencial nutraceutico o de xenohormesis.....	39
3.4.1 Actividad antioxidante por el método de ABTS.....	39
3.4.2 Actividad antioxidante por el método de DPPH.....	39
3.5 Análisis estadísticos.....	40
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
4.1 Determinación los métodos adecuados de extracción de elicitores bióticos.....	41
4.2 Determinación del incremento de la hormesis en <i>Capsicum annuum</i> al aplicar los elicitores bióticos en precosecha.....	43
4.3 Determinación del potencial nutraceutico o de xenohormesis .....	46
<b>V.CONCLUSIÓN</b>	<b>53</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Diferentes elicitores bióticos induciendo curvas tipo horméticas en diferentes especies.....	9
<b>Cuadro 2.</b> Efecto de diferentes elicitores bióticos en respuesta de defensa en plantas....	24
<b>Cuadro 3.</b> Principales grupos de investigación alrededor del mundo.....	33
<b>Cuadro 4.</b> Diseño de experimentos.....	38
<b>Cuadro 5.</b> Condiciones de crecimiento para hongos.....	45
<b>Cuadro 6.</b> Condiciones de crecimiento para bacterias.....	46
<b>Cuadro 7.</b> Rendimiento de hongos y bacterias.....	46
<b>Cuadro 7.</b> Cantidad de fenoles, flavonoides y taninos de extractos de chile.....	46
<b>Cuadro 9.</b> Capacidad antioxidante de extractos de chile .....	47
<b>Cuadro 10.</b> Correlación entre los compuestos y la actividad antioxidante de los extractos de chile.....	46



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efecto de los elicitores bióticos en la hormesis.....	10
<b>Figura 2.</b> Curva de hormesis de los frutos de chile bajo la influencia del elicitores bióticos de <i>P. capsici</i> .....	50
<b>Figura 3.</b> Curva de hormesis de los frutos de chile bajo la influencia del elicitores bióticos de DNA homólogo.....	51
<b>Figura 4.</b> Curva de hormesis de los frutos de chile bajo la influencia del elicitores bióticos de DNA homólogo.....	51
<b>Figura 5.</b> Curva de hormesis de los frutos de chile bajo la influencia del elicitores bióticos de <i>C. annum</i> .....	52

# 1. INTRODUCCIÓN

El primer capítulo aborda el tema de investigación, el planteamiento del problema, la justificación y la hipótesis. También se presentan los objetivos tanto general como particulares.

## 1.1 Antecedentes

Cuando las plantas decidieron colonizar la tierra, tuvieron que evolucionar a partir de sus antepasados acuáticos unicelulares a estructuras multicelulares complejas (Wodniok, 2011). Con la finalidad de facilitar la supervivencia de las plantas y posteriormente el establecimiento de los ecosistemas terrestres, uno de los acontecimientos indispensables fue la interacción con microorganismos patógenos y simbióticos (Baluška y Macuso, 2013). La importancia de las interacciones bióticas reside en el hecho de que las plantas seleccionan rasgos genéticos para establecer su aptitud física y así, evitar su extinción (Occhipinti, 2013). La modificación de los atributos físicos y fisiológicos de las plantas terrestres actualmente conocidas (embriofitas), que les permiten sobrevivir, es posible gracias a un proceso conocido como plasticidad que da lugar a la producción de órganos para hacer frente a las condiciones ambientales, como consecuencia de la evolución. Algunos de los cambios sufridos por las plantas se hicieron con el propósito de cubrir sus necesidades básicas en el nuevo ambiente donde se desarrollaban, tales necesidades fueron la nutrición, reproducción, crecimiento y capacidad de interacción y respuesta a factores externos. Dentro de los factores externos, que muestran un efecto de respuesta en las plantas se encuentran los factores bióticos y abióticos, los primeros comprenden organismos enteros o parte de ellos, mientras que los factores abióticos incluyen la desecación, la radiación UV y la temperatura, entre otros.

A lo largo de los procesos evolutivos de adaptación, diversos factores ambientales han tenido una influencia importante en el aumento del grado de complejidad de los sistemas vegetales. Esto implica aprovechar su sistema de metabolismo para producir una serie de características estructurales y químicas que les permita afrontar los factores desafiantes

presentes en los ecosistemas (Pusztahelyi *et al.*, 2015). La aparición de un metabolismo primario que está presente como una característica común en las plantas, sufre varias modificaciones hasta que se produce un metabolismo secundario. Internamente, el metabolismo especializado en plantas evolucionó mediante la transferencia horizontal de genes de otras especies, es decir, rasgos influenciados por diferentes condiciones selectivas y por el efecto de varios factores externos (Gao *et al.*, 2014). La alta diversidad estructural de los compuestos secundarios, producto del metabolismo presente en todas las plantas evolucionó por separado, restringido a linajes de grupos vegetales específicos (Pichersky y Lewinsohn, 2011), e internamente en una planta individual están limitados por el espacio y el tiempo.

El propósito principal de las plantas es sintetizar compuestos que mantengan en alerta a las plantas, como estrategia de defensa para superar las limitaciones de estrés ambiental externo o para hacer frente a sus enemigos, así como para permitir la comunicación con otros organismos (Veyrat *et al.*, 2016); sin embargo, cuando los frutos están completamente maduros, las plantas necesitan de herbívoros vertebrados para la dispersión de las semillas (Whitehead y Poveda, 2011).

Actualmente los metabolitos secundarios son utilizados a menudo en las industrias farmacéutica, agroquímica y alimentaria debido a sus aplicaciones potenciales como aditivos alimentarios, sabores, fármacos entre otros. El desarrollo de la interacción entre plantas y factores bióticos externos durante mucho tiempo ha dado lugar a respuestas estructuradas causadas en las plantas como señales químicas o mecánicas. Previa investigación indican que el reconocimiento de factores externos por parte de las plantas desencadenan procesos de señalización que modifican su metabolismo, generando respuestas que benefician el desarrollo de la planta. Sobre la base de lo indicado anteriormente, se propone que estos factores se denominen elicitores bióticos, bioestimulantes o controladores biológicos; debido a que las plantas acumulan metabolitos en respuesta a condiciones de estrés (García-Mier *et al.*, 2013; Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Actualmente se han enfocado diversas estrategias para la acumulación efectiva de metabolitos empleando elicitores bióticos en plantas o cultivos celulares de plantas. Sin embargo, la inducción de los metabolitos se acompaña de un

costo indeseable en la producción de biomasa al asignar recursos a las defensas en vez de al crecimiento y reproducción de las plantas (Vos *et al.*, 2013).

Recientemente, las prácticas agrícolas deben cubrir tanto la seguridad alimentaria como las necesidades nutricionales de la población, todo ello dentro de las actividades sostenibles. Hasta ahora las prácticas agrícolas, definidas como convencionales, concentran sus esfuerzos en mejorar los rendimientos de los cultivos, dejando a un lado la calidad nutricional de las plantas comestibles, esta última relacionada con la acumulación de metabolitos secundarios que son inducidos por elicitores bióticos (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). En contraparte, la agricultura ecológica, intenta volver a las prácticas de crecimiento bajo condiciones de estrés que logran acumular gran cantidad de nutraceuticos, sin embargo no se logran obtener los rendimientos deseados (García-Mier *et al.*, 2013).

Resultados preliminares sugieren que las respuestas a elicitores bióticos químicos en frutos cosechados, son altamente significativas (García-Mier *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha reportado que los elicitores bióticos químicos pueden ser tóxicos, tanto para la planta, como para el consumidor (Aranega-Bou *et al.*, 2014). Existen reportes recientes del efecto hormético -dosis respuesta bifásica- en las plantas, los animales, así como microorganismos (Garzon y Flores, 2013). Sin embargo, los compuestos comúnmente utilizados son químicos inorgánicos o radiaciones, que pueden tener efectos dañinos a la salud. Se cree que los elicitores bióticos inducen una respuesta mas favorable en la planta, debido a que existen receptores específicos en la planta para cualquiera de los tipos de patrones moleculares (DAMPs, MAMPs o PAMPs), que son las moléculas que inician y amplifican las vías de defensa (Land *et al.*, 2015). Además, los elicitores bióticos modifican el metabolismo activando, suprimiendo, reduciendo o incrementando vías de defensa, cambiando la cantidad y tipo de metabolitos secundarios. La xenohormesis por su parte, se refiere a la capacidad que tienen las plantas a las cuales se les ha inducido hormesis para conferir tolerancia al estrés a los seres vivos que los consumen (Hooper *et al.*, 2010). Los compuestos de defensa de las plantas en altas concentraciones pueden ser tóxicos para las células de mamífero; aunque, las dosis subtóxicas pueden inducir respuestas de adaptación, por su propiedad de nutraceuticos.

## 1.2 Planteamiento del problema

El enfoque actual de la agricultura convencional permite obtener altos rendimientos en los cultivos mediante la implementación de prácticas agrícolas que reducen el estrés a las plantas durante su ciclo de vida. Lo anterior genera que las plantas canalicen pocos o nulos recursos a la síntesis de metabolitos secundarios para su defensa, que se traduce en la producción de menos cantidad de metabolitos secundarios menos cantidad y calidad de productos nutraceuticos, afectando así el valor funcional de los alimentos (Davis, 2004). Actualmente diversas estrategias convencionales se han enfocado al incremento de la cantidad de compuestos nutraceuticos, entre ellos se encuentran el desarrollo de organismos genéticamente modificados, cultivo de células vegetales *in vitro*, síntesis química a partir de precursores, etc; muchas de estas técnicas requieren de equipos especializados, de mayor costo y no pueden ser escaladas a nivel industrial, es decir sólo son desarrolladas a nivel laboratorio. Entre las técnicas más factibles y de menor costo para la producción de metabolitos secundarios se encuentra el uso de elicitors. Sin embargo, los estudios de su manejo hormético sólo se han centrado en el uso de compuestos químicos que son tóxicos tanto para la planta como para los seres humanos (Calabrese, 2009).

Debido a lo anterior, actualmente no existen estudios que determinen el adecuado manejo de la hormesis con el uso de elicitors bióticos; lo que permitiría la síntesis de compuestos deseados en determinada etapa fenológica y mantener los rendimientos de su producción en invernadero, cubriendo la demanda del consumidor pero con frutos de mayor calidad nutricional.

### 1.3 Justificación

Se justifica el estudio de los límites de hormesis mediante elicitores bióticos como una estrategia para la generación de prácticas agrícolas que permitan sacar mayor provecho de los cultivos manejando un balance adecuado del rendimiento y producción nutracéutica. Lo anterior debido a que los compuestos nutracéuticos provenientes de las plantas por efecto de la hormesis, tienen la capacidad de incidir en la disminución de la cantidad de enfermedades no transmisibles por las actividades biológicas que presentan (Viacava *et al.*, 2014). También permite mayor extracción de nutracéuticos de importancia industrial en los cultivares para ser adicionados a algunos alimentos permitiendo una mayor producción de alimentos funcionales. El estilo de vida actual - el cambio demográfico de las personas de la tercera edad y la urbanización - demanda alimentos que garanticen la seguridad alimentaria. A pesar de que la agroquímica ha permitido soportar el problema de reducción de espacios de siembra y aumento de la población, así como el abasteciendo la alimentación humana, la aplicación de compuestos tóxicos perjudican tanto la salud como el equilibrio ambiental. El manejo adecuado de la hormesis debido a que permite establecer un equilibrio entre la calidad nutracéutica de los cultivos y su rendimiento, permite cubrir la demanda de alimentos entre la población. El mantenimiento de los rendimientos se logra por que los elicitores bióticos inducen el sistema inmune de las plantas disminuyendo las pérdidas en los cultivos por aparición de bacterias, parásitos y virus.

El modelo propuesto para el estudio de la presente investigación es el chile, una de las razones por las cuales se eligió esta especie es debido a que México ocupa el segundo en producción de especies del género *Capsicum* sp., es el principal consumidor a nivel mundial (FAO, 2012) y el país con la más alta diversidad genética del género *Capsicum* (Ibarra-Torres, 2015); además de que pertenece a la familia de las solanáceas, este hecho permite que pueda ser comparado con otros cultivares de la misma familia como por ejemplo el jitomate, que junto con el chile forman parte de las hortalizas más consumidas a nivel mundial y con gran cantidad de compuestos nutracéuticos (FAO, 2012).

## 1.4 Hipótesis

El manejo adecuado de la hormesis en precosecha del pimiento, establece un equilibrio entre los potenciales de rendimiento y de xenohormesis.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1

#### Objetivo General

Establecer las condiciones que permitan el manejo de la hormesis en pimiento en precosecha usando elicitores bióticos y determinar su potencial nutracéutico

### 1.5.2

#### Objetivo Particulares

1. Establecer los métodos adecuados para la extracción de elicitores bióticos.
2. Determinar el incremento de la hormesis en *Capsicum annuum* al aplicar los elicitores bióticos en precosecha.
3. Determinar del potencial nutracéutico o de xenohormesis.



## 1.6 Contenido de la tesis

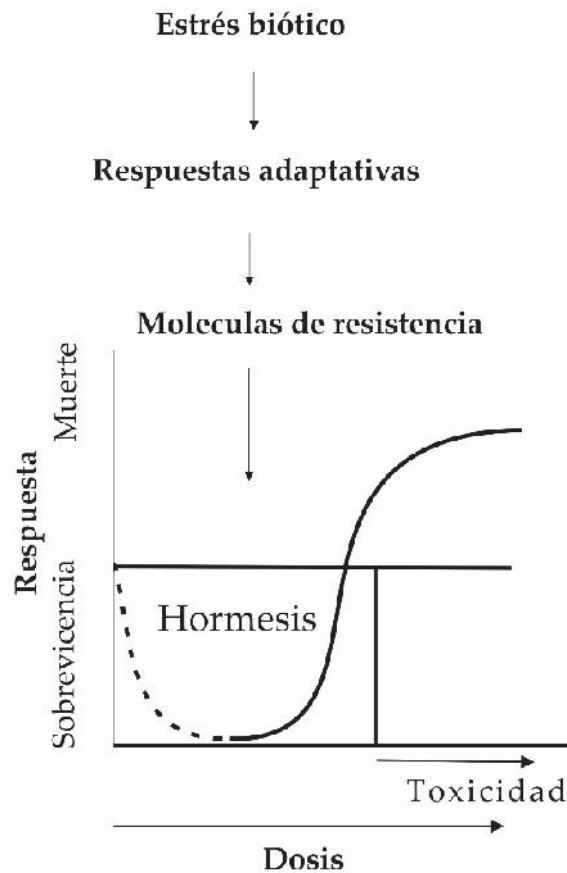
En el capítulo II se abordan, analizan y discuten todos los informes científicos publicados en el área del conocimiento de los objetos de estudio a tratar. Por otro lado, se presenta los principales grupos de investigación actuales, clasificados por países. El capítulo III se enfoca en la descripción de las metodologías necesarias para la realización de la tesis primeramente se describe como se obtuvieron los diferentes elicitores bióticos, posteriormente su efecto en los chiles en precosecha y por último su efecto relacionado con la xenohormesis. También se abordan los resultados obtenidos en esta investigación. Por último, en el capítulo IV se detallan los resultados, la conclusión y por último las perspectivas de investigaciones futuras.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Hormesis en plantas

Hormesis puede definirse como una respuesta bifásica en la que altas dosis de una condición de estrés podría causar inhibición mientras baja dosis la misma, puede causar estimulación (Calabrese, 2009). Este término se ha caracterizado ampliamente en el campo de la toxicología, sin embargo esfuerzos considerables se han centrado en su aplicación en la biología vegetal y las áreas de la agricultura (Calabrese, 2014). Los cambios sufridos en las células u organismos a bajas dosis de estrés se reflejan en un fenotipo alterado inducido por el medio ambiente, lo anterior puede traducirse en un potencial de plasticidad (Calabrese y Mattson, 2011). Análisis de varios informes de hormesis, aproximadamente 8,000 respuestas de dosis-respuesta dentro de una base de datos, concluye que la hormesis posee las siguientes características: es altamente generalizable, esta presente en cualquier modelo biológico, en cualquier proceso fisiológico y se induce con cualquier agente de estrés físico/químico; además que la respuesta observada típicamente cae dentro de un rango de aproximadamente 30-60% más alta que los valores observados para el control (Calabrese y Blain, 2005, Calabrese y Blain, 2011; Calabrese y Mattson, 2011). Es indispensable considerar que para la evaluación y caracterización del proceso de hormesis los diseños experimentales requieren gran cantidad de dosis, mayor cantidad de individuos y mayor cantidad de replicas (Calabrese, 2014). Existen diversos mecanismos celulares y moleculares que se pueden inducir cuando esta presente la hormesis en las plantas, que incluyen la activación de las vías de señalización de factores de crecimiento, canales iónicos, quinasas y desacetilasas y factores de transcripción responsables de la producción de proteínas citoprotectoras como chaperones y genes de supervivencia celular (Mattson, 2008). Se han realizado estudios en plantas principalmente midiendo como punto final el crecimiento, metabolismo, supervivencia, reproducción, sin embargo, los estudios de la respuesta inmune de la planta son poco conocidas (Calabrese y Blain, 2011). Vale la pena mencionar que existe una estrecha relación entre las respuestas de defensa en las plantas y la activación del metabolismo secundario. La

hormesis de la planta se ha llevado a cabo a menudo usando herbicidas o fitotoxinas (Belz y Duke, 2014); sin embargo, no existe información alguna de estudios de hormesis en plantas utilizando elicitores bióticos no tóxicos, todos los reportes se realizan con compuestos químicos los cuales poseen un efecto perjudicial potencial en plantas de cultivo causado por la toxicidad de los compuestos (Belz y Duke, 2014). Los únicos estudios que evalúan a los elicitores bióticos como compuestos horméticos se realiza mediante el uso de compuestos fitotóxicos. Nosotros proponemos que los elicitores bióticos pueden inducer hormesis en las plantas como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Efecto de los elicitores bióticos en la hormesis.

Algunos compuestos fitotóxicos como la partenina en diferentes concentraciones (12 concentraciones en un rango de 0.03–6  $\mu\text{mol}$ ) se reportó que inducía el crecimiento de raíces bajo diferentes parámetros fisiológicos mostrando curvas de hormesis, alcanzando el mayor crecimiento de raíces entre las concentraciones de 0.23-0.65  $\mu\text{mol}$  (Belz y Cedergreen, 2010).

El manejo de la hormesis puede ser una estrategia importante para satisfacer la demanda de alimentos manteniendo los rendimientos deseables en los cultivos y aumentar la capacidad nutracéutica de los mismos. Lo anterior, se basa en el reconocimiento de los elicitores bióticos por receptores vegetales que pueden inducir la síntesis de compuestos nutracéuticos. A continuación, se presenta una tabla de los elicitores bióticos que pueden mostrar una curva tipo hormética (Caudro, 1).

**Cuadro 1.** Diferentes elicitores bióticos induciendo curvas tipo horméticas en diferentes especies.

Tratamiento/dosis	Specie/punto final	Maximo efecto	Referencias
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0, 0.1,0.5, 1.0, ó 1.5 mM)	<i>Vigna unguiculata</i> (área de la hora, altura apical, largo de la raíz, peso fresco apial y de la raíz, peso seco de la raíz)	0.5 mM	(Hasan <i>et al.</i> , 2016)
AS (0, 50, 100, 150, 200 mg. l <sup>-1</sup> )	Rendimiento en semillas de arroz	100 mg l <sup>-1</sup>	(Tavares <i>et al.</i> , 2014)
SA (0, 1.38, 13.8, 69.09, 138.12 mg l <sup>-1</sup> )	Semillas de trigo (altura y peso)	SA 1.38 mg l <sup>-1</sup>	(Salitxay <i>et al.</i> , 2016)
JA (0, 50, 100, and 150 $\mu\text{M}$ )	<i>Calendula officinalis</i> (peso)	50 $\mu\text{M}$	(Wiktorowska <i>et al.</i> , 2010)
Quitosan (0, 25, 50, 75 y 100 ppm)	<i>Vigna radiata</i> (L.) peso seco, índice de cosecha y fotosíntesis	75 ppm	(Mondal <i>et al.</i> , 2013)
Quitosaídos (1, 10, 50, 100, 500 and 1000 mg. l <sup>-1</sup> )	Interacion simbiótica de frijol con <i>Bradyrhizobium</i> (numero y peso de los nódulos de raíz)	100 mg l <sup>-1</sup>	(Costales <i>et al.</i> , 2015)

Elicitor de <i>Verticillium dahliae</i> Kleb., (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mg l <sup>-1</sup> )	<i>Artemisia annua</i> (crecimiento)	0.4 mg l <sup>-1</sup>	(Hong <i>et al.</i> , 2000)
Extracto de la fracción polisacárida de <i>T. atroviride</i> D16 (30, 60, y 180 mg l <sup>-1</sup> )	<i>Salvia miltiorrhiza</i> (crecimiento de raíces a 6, 12 y 18 días)	30 mg l <sup>-1</sup> (6, 12 d) 69 mg l <sup>-1</sup> (18 d)	(Ming <i>et al.</i> , 2013)
Productos metabólicos de <i>Streptomyces</i> y <i>Bacillus</i> , (0, 1, 2, 3 ml l <sup>-1</sup> )	Semillas de trigo (altura y peso)	1 ml l <sup>-1</sup> ,	(Salitxay <i>et al.</i> , 2016)
MeJA (0, 30, 100, 300 y 1000 µl l <sup>-1</sup> )	<i>L. longiflorum</i> y <i>L. speciosum</i> crecidos in vitro (peso y número de bulbos)	30 µl l <sup>-1</sup> y 300 µl/l	(Jasik <i>et al.</i> , 2006)
MeJA (1, 5, 10, 20 ml l <sup>-1</sup> )	Semillas de trigo (altura y peso)	1 ml l <sup>-1</sup>	(Salitxay <i>et al.</i> , 2016)
Pectina (2, 4, 6 mg l <sup>-1</sup> )	<i>C. officinalis</i> (crecimiento)	2 mg l <sup>-1</sup> (12 y 24 h) 4 mg l <sup>-1</sup> (72 y 96 h)	(Wiktorowska <i>et al.</i> , 2010)
Parthenin (0.03–6 µmol)	<i>L. sativa</i> var. capitata cv. Maikönig or cv. Hilro (largo de las raíces)	0.23-0.65 µmol	(Belz <i>et al.</i> , 2010)

## 2.2 Reconocimiento de la planta y sus mecanismos de defensa

Las plantas, debido a la falta de movilidad, están expuestas a factores ambientales adversos que no pueden ser evitados y que tienen una influencia directa sobre su desarrollo. Los factores adversos incluyen no sólo condiciones físicas tales como salinidad, temperatura, sequía, radiación, sino también interacción planta-organismo. Afortunadamente, los organismos poseen información genética para producir cambios en el fenotipo que conducen al proceso de adaptación. Estos cambios en las plantas incluyen una serie de defensas aún más eficaces. Por otro lado, hay factores que también limitan su desarrollo, incluyendo la coexistencia con otros organismos vivos, tanto beneficiosos como no beneficiosos. Un proceso importante en la interacción planta-organismo es el reconocimiento entre lo propio y lo ajeno (Coers, 2013). Por lo tanto, es importante, después del reconocimiento del microorganismo, dar una respuesta

con un alto grado de especificidad, según el tipo de microorganismo, dependiendo de uno o pocos genes presentados tanto por planta como por patógeno. La especificidad también se produce en los órganos, algunos organismos se desarrollan en un solo tejido, o en partes ya sea sobre o bajo el suelo (Jones y Dangl, 2006; Strugala *et al.*, 2015). El inicio de este proceso está dado por barreras físicas y químicas seguidas del reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos o patógenos (MAMPs o PAMPs), y/o patrones moleculares asociados a daños (DAMPs) por receptores de reconocimiento de patrones transmembrana (PRRs); resultando en inmunidad desencadenada por PAMP (PTI). Posteriormente, los agentes patógenos liberan efectores que son reconocidos por el huésped causando una susceptibilidad desencadenada por el efector (ETS), induciendo resistencia a la enfermedad y una respuesta hipersensible en las plantas provocando muerte celular (HR). Los patógenos tratan de evitar la ETI a través de una lucha constante para evadir el sistema de defensa de la planta mediante la síntesis de compuestos denominados efectores. Este proceso de reconocimiento previene la propagación de la enfermedad a través de la planta restringiendo la invasión a través de la resistencia inducida sistémica (SIR). El tiempo utilizado para inducir las respuestas al estrés es importante para la planta, cuanto más rápido responde al ataque patógenos, más fácil es hacer frente a la infección (Newman *et al.*, 2013). Después de un encuentro de patógenos vegetales con su huésped, la susceptibilidad del huésped disminuye a los ataques posteriores de patógenos, al proceso anterior se le conoce como priming. Además de lo anterior, uno de los SIR es la resistencia adquirida sistémica (SAR) caracterizada por dar una resistencia perdurable durante mucho tiempo, consta de necrosis localizada, expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR) y acumulación de ácido salicílico. Evento que resulta en el encuentro entre el huésped y el microorganismo que puede provocar simbiosis, enfermedad o resistencia a enfermedades, sin embargo, el microorganismo no patógeno también puede inducir una resistencia sistémica en las plantas aunque en menor grado (Pieterse *et al.*, 2014). Los productos resultantes del mecanismo de defensa son: el refuerzo de la pared celular, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la síntesis de fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs).

La resistencia de las plantas a un microorganismo patógeno depende de su especificidad. Las diferencias en el grado en que las plantas están siendo infectadas y el fracaso en la infección dependen de los cambios de genotipos causados por la evolución del hospedero y del patógenos (Antonovics, 2013). Existen dos tipos de resistencia en las plantas, la resistencia del huésped y la no huésped, en estas las respuestas durante la infección son muy similares (Thakur y Sohal, 2013). La resistencia de no huésped, está presente en especies de plantas enteras a un patógeno no adaptado (Cheng y Li *et al.*, 2012). Para este último se han propuesto dos tipos I y II resistencia de no hospedero (NHR), el primero no produce síntomas visibles mientras que el tipo II NHR induce rápida respuesta hipersensible en la cual se observa la muerte celular (Cheng *et al.*, 2012). La resistencia del huésped, por otro lado, está dada por la especificidad de la raza patógena o cultivar de la planta, y está mediada por las interacciones de los genes de resistencia (R) y avirulencia (avr), este proceso se explica por el modelo gen por gen (Cheng *et al.*, 2012). La resistencia de la planta y la avirulencia del patógeno está presente cuando el reconocimiento de los genes R y sus correspondientes genes Avr ocurren (Thakur y Singh, 2013).

### 2.3 Priming en las plantas

Las plantas tienen la capacidad de aprender de las experiencias de estrés anteriores. Como parte de la evolución, las plantas han desarrollado un proceso de priming con la finalidad de evadir situaciones peligrosas. El proceso de priming posee ciertas características, se establece en el tejido expuesto a los elicitores bióticos y en las partes distales, además la respuesta se presenta frente a un amplio espectro de microorganismos, también la activación de la respuesta, en ataques posteriores es más rápida, más fuerte y duradera o tiene represión atenuada (Conrath *et al.*, 2015, Martínez-Medina *et al.*, 2016). La principal ventaja que ofrece priming es la reducción del costo metabólico de las plantas, por ejemplo, atraer a los enemigos naturales del herbívoro puede producir un costo menor que la inducción de defensas directas y por otro lado tener la capacidad de mantener la aptitud en ambientes complejos (Conrath *et al.*, 2015, Martínez-Medina *et al.*, 2014). Una ventaja que ofrece la

aplicación en la agricultura, es que puede pasar por generaciones, lo que significa que es componente epigenético de la defensa transgeneracional (Martinez-Medina *et al.*, 2014). Cuando las plantas son expuestas a diferentes factores de estrés pueden inducirse diversos tipos de inmunidad sistémica en las plantas, incluyendo SAR e ISR (Aranega-Bou *et al.*, 2014; Pieterse *et al.*, 2014). El mecanismo responsable de este proceso en las plantas no ha sido completamente descifrado. Algunos de los componentes que desempeñan un papel central en el cebado mediador de SA en *A. thaliana* son las proteínas quinasas 3 y 6 activadas por Mitógeno (Beckers *et al.*, 2009), los factores de transcripción MYC2 (Pozo *et al.*, 2008), los niveles elevados de receptores de reconocimiento tales como FLS2, CERK1 (Tateda *et al.*, 2014) y modificaciones epigenéticas (Jaskiewicz *et al.*, 2011). Algunos productos químicos tienen la capacidad de impulsar las respuestas de defensa y, por lo tanto, también los procesos de priming, sin embargo el uso de sustancias químicas presentan impactos negativos al medio ambiente y también un grado determinado de toxicidad para las plantas (Aranega-Bou *et al.*, 2014). El primer estudio de priming en plantas se ha realizado con compuestos de origen no biótico, aun que la caracterización de compuestos derivados bióticos para inducir el priming ya está estudiada en vitaminas, quitosanos, oligogalacturónidos, compuestos orgánicos volátiles, ácido azelaico y piperónico, entre otros (Aranega-Bou *et al.*, 2014). Los estudios en condiciones controladas pueden ser factibles para plantas de cultivo, pero los estudios realizados en invernaderos están limitados en parte por el gran número de población cultivada y porque el control de diferentes fuentes de estrés es más difícil.

## 2.4 Elicidores bióticos como inductores en plantas

Los elicidores bióticos son factores que interactúan con las plantas y que inducen las respuestas de defensa e incluyen estrés tanto biótico como abiótico. Cuando se habla acerca del estrés biótico, se hace referencia a organismos completos o parte de ellos. Entre los organismos benéficos o patógenos se encuentran bacterias, hongos, virus, nemátodos y plantas. Dentro de la estructura química se incluye moléculas orgánicas, por ejemplo, polímeros de



carbohidratos, lípidos, glicopeptidos y glicoproteínas o químicos tales como ácido salicílico, quitosano y peróxido de hidrógeno, entre otros. Varios informes han documentado la modificación del metabolismo en las plantas, mediante el aumento o disminución de compuestos específicos de metabolitos secundarios de acuerdo con elicitores bióticos presente en ese momento. Los compuestos sintetizados en las plantas por la influencia de elicitores bióticos pueden clasificarse como compuestos fenólicos, terpenos y compuestos que contienen azufre y azufre, de acuerdo con las vías que son presentadas por las vías fenilpropanoides, isoprenoides o alcaloides (Jiménez-García *et al.*, 2013).

#### **2.4.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)**

Las plantas han aprovechado los cambios evolutivos para ajustar su metabolismo con el fin de aumentar la resistencia contra los patógenos y la tolerancia al estrés abiótico. Desde la aparición de organismos aeróbicos, el oxígeno ha sido la molécula principal de la respiración (Krumova y Cosa, 2016). Uno de los mayores éxitos evolutivos es la producción de ROS, subproductos del metabolismo aeróbico, que sirven para combatir patógenos invasores debido a sus propiedades tóxicas contra las células (O'Brien *et al.*, 2012). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se generan como productos inevitables a través de los procesos normales de respiración, específicamente en cadenas de transporte de electrones en cloroplasto y mitocondrias. Entre los ERO principalmente se encuentran: anión radical de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), moléculas de oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) con propiedades reactivas determinadas por su configuración electrónica y potencial redox (Krumova y Cosa, 2016). Esas moléculas se generan en algunos órganos incluyendo mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas y membrana plasmática. Las ERO pueden ser inducidas como consecuencia a las condiciones de estrés que giran sobre las respuestas de defensa que desencadenan eventos de transducción de señales, tales como cascadas de proteína quinasa activadas por mitógenos, provocando respuestas celulares específicas, lo que podría resultar en la síntesis de diversas moléculas de defensa tales como metabolitos secundarios. Los niveles de especies reactivas pueden ser modulados por dos sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos a un nivel deseado en el proceso de adaptación

(Sewelam *et al.*, 2016). El peróxido de hidrógeno es una molécula señal con la capacidad de activar las respuestas de defensa distales (Bienert y Chaumont *et al.*, 2014). Estudios anteriores han mostrado un aumento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas bajo la influencia de varios elicitores bióticos. Otros estudios también han demostrado su papel como elicitores bióticos participando en la expresión de *pal* y *cat1*, indicadores de señalización específica de estrés oxidativo y *pr1* como indicativo de estrés biótico (Mejía-Teniente *et al.*, 2013). Los eventos anteriores permiten al peróxido de hidrógeno modular diversos procesos del desarrollo de la planta, incluyendo el desencadenamiento de la tolerancia bajo el efecto de varias tensiones abióticas y bióticas (Hossain *et al.*, 2015).

#### 2.4.2 Organismos fitoatógenos

Desde el comienzo de la agricultura, se han presentado diversos problemas, una de ellas es la aparición de enfermedades y plagas, la cual aumentó dramáticamente en los últimos años, y ha representado pérdidas en los rendimientos de los cultivos. Las condiciones ambientales determinan la tasa de desarrollo de las enfermedades al dotarlas de microclimas apropiados, afectando su ciclo de vida y dispersión. Hay múltiples factores que determinan el brote, la incidencia de las enfermedades y su gravedad. Algunos de ellos incluyen condiciones ambientales, altas densidades de plantas (Beruski *et al.*, 2016), susceptibilidad de las variedades (Achon, 2015), residuos vegetales (Bonanomi, 2006), trastornos de las plantas causados por deficiencia de nutrientes entre otros. Las plantas sufren el ataque constante de varios patógenos. Para terminar con la infección, las plantas han desarrollado mecanismos constitutivos e inducibles. Las plantas a lo largo del tiempo han desarrollado la capacidad de comunicarse vía química y física con factores externos. Después de un ataque patógeno la estimulación del sistema inmune responde por la activación de los genes de defensa, la formación de especies reactivas, la síntesis de proteínas PR, así como el refuerzo de la pared celular. Los eventos tempranos después del reconocimiento de patógenos consisten en una elevación de la concentración de calcio en las células vegetales (Zhang, 2014), producción de ROS, flujos de iones a través de la membrana plasmática, cascadas de fosforilaciones y desfosforilaciones (Nicaise *et al.*, 2009), respuestas de alcalinización extracelular (Albert,

2013). A las pocas horas de la inducción de la actividad PAL y LOX (Duan *et al.*, 2014), y como resultado estimulación de las vías shikimato, fenilpropanoide, oxilipinas y auxina, producción de respuestas específicas de defensa reguladas por SA o JA Como la acumulación de fitoalexinas y proteínas PR (Alvarez, 2016), también transcripciones relacionadas con la senescencia, y los factores de transcripción WRKY (Phukan, 2016); También se ha observado la biosíntesis de indolilglucosinolatos (IGS) y camalexina, regulada en parte por la proteína KINASE3 (MPK3) y MPK6 activada por MITOGENO (Xu *et al.*, 2016). La aplicación de elicitores bióticos es una estrategia eficaz para el control de enfermedades al inducir resistencia en plantas contra patógenos y herbívoros artrópodos, se ha sugerido que funcionan como señales necesarias para la expresión de las defensas descritas anteriormente. Los elicitores bióticos orgánicos que son capaces de desencadenar respuestas de defensa comprenden compuestos derivados de bacterias, hongos, plantas, nematodos o fuentes animales. Los constituyentes microbianos conservados de las capas externas de hongos y bacterias tales como quitina y quitosana (quitina desacetilada), flagelina, peptidoglicanos, lipopolisacáridos, glucanos, esteroides, entre otros, que tienen su correspondiente receptor de reconocimiento de patrones (PRR), actúan como potentes elicitores bióticos contra Patógenos fúngicos (Wiesel *et al.*, 2014) afectan la producción de isoflavonas (Al-Tawaha, 2011) y la reducción de la incidencia de enfermedades (Giotis, 2012). Dado que los hongos, los insectos y los nematodos tienen estructuras de quitina y quitosano, pueden ser reconocidos como objetivos para las plantas para iniciar respuestas de defensa (Bueter *et al.*, 2013). Sin embargo, los patógenos contrarrestan la respuesta de la planta para escapar o engañar a la planta a través de cambios en sus componentes de la pared celular, como ocurre actualmente en la interacción de rizobios y plantas. (Fujikawa *et al.*, 2012). Los cambios en la estructura de los factores de Nod (NFS), que consisten en oligosacáridos de quitina, permiten llevar a cabo el proceso de simbiosis entre leguminosas y rizobios en la raíz (Rich, 2014). Los cambios en los pesos moleculares y los grados de acetilación del quitosano influyen en las respuestas de resistencia inducida por las plantas en la protección de las plantas contra patógenos (Jail, 2014). La reducción de la incidencia de varias infecciones en las plantas depende de las concentraciones del estimulante. Las plantas activan vías de transducción de señales de red intrincadas después del reconocimiento de patógenos, se regulan de acuerdo con la especificidad de las clases de

patógenos o tipo de estrés. Los principales MAMPs en bacterias es la estructura de la pared celular flg22 derivada de la proteína flagelin y el factor de elongación (EF) -Tu (Trdá, 2015). Los estudios realizados para evaluar los cambios transcripcionales en *Arabidopsis* tratados con dos inductores, Flg22 y OGs, indican una respuesta temprana altamente correlacionada, pero hay diferencias en la activación en respuestas tardías (Denoux, 2008). Diferentes elicitors presentan cambios, variando en magnitud y tiempo, en la concentración de  $Ca^{2+}$  (Tuteja, 2007). Muchas plantas a lo largo de su desarrollo están expuestas a diferentes tipos de estrés, que pueden afectar simultáneamente, por lo que la planta debe responder a aquello que considera más importante. Los estudios indican que mientras que un cierto estrés abiótico como el UV-B puede inducir la producción de compuestos protectores, mientras que la inducción del inductor biótico flg22 puede suprimir este proceso y estimular la producción de compuestos relacionados con la defensa en *A. thaliana* (Schenke, 2011).

El uso de organismos vivos no patógenos puede ser una herramienta importante para el control biológico, sin embargo su uso en el campo es difícil debido a los riesgos involucrados en su introducción al nivel ecológico, entonces debe haber otras maneras de inducir las respuestas de defensa utilizando microorganismos inactivados o muertos (Veloso y Díaz, 2012). Los patógenos de las plantas se pueden clasificar en biotróficos, necrotrofos y hemibiotróficos, los primeros obtienen energía de las células vivas mientras que los necrotrofos obtienen la energía de las células muertas. Hemibiotróficos durante parte del ciclo de infección se desarrollan como biotrófico, lo que requiere que las células vegetales vivas sobrevivan, pero más tarde sufren transiciones al necrotrof (Pusztahelyi *et al.*, 2015). Las vías que inducen la resistencia sistémica como HR y SAR están reguladas por las hormonas de las plantas SA y JA. Los necrotrofos inducen la activación de la vía de señalización del ácido jasmónico (JA), contrariamente a los biotrofos que inducen la vía de señalización del ácido salicílico (SA) (Rahman, 2012). Se ha demostrado que estas vías son antagonistas, debido a esta condición algunos patógenos tienen la capacidad de manipular estas vías para proliferar y desarrollar la enfermedad en las plantas o perturbar su desarrollo esencial y/o fisiológico (Rahman, 2012; Kazan y Lyons, 2014). Su estrategia es producir efectores que se unen a receptores de

hormonas vegetales, activadores y represores de la transcripción e interrumpir la señalización (Kazan y Lyons, 2014). Los patógenos biotróficos inducen resistencia a razas específicas a través del reconocimiento efector por genes R tras una inducción de respuestas de HR. La respuesta hipersensible causa una muerte celular rápida debido al efecto del aumento de ROS (Michelmore *et al.*, 2013). La resistencia adquirida sistémica (SAR) es una resistencia duradera a una subsiguiente infección patógena, inducida por la exposición temprana al microorganismo. Proporciona protección a la planta contra un amplio espectro de microorganismos, en diferentes tejidos donde se realiza la exposición (planta entera) (Pieterse *et al.*, 2014). La memoria adquirida, como resultado de este proceso, también se puede heredar a generaciones posteriores. Las principales características de la SAR son de importancia vital para ser consideradas en la producción de cultivos (Gao *et al.*, 2015). La señalización principal de la molécula responsable de inducir este proceso es el ácido salicílico y algunas reacciones específicas de SAR son patogénesis- (Genes PR). El objetivo principal del uso de elicitors bióticos de origen orgánico, entre otros, es investigar una gran cantidad de bioactivos.

### **2.4.3 Organismos benéficos**

Durante su desarrollo, las plantas interactúan con microorganismos patógenos tanto como con microorganismos benéficos, rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPR), hongos micorrizales y rizobios simbióticos. Esos microorganismos colonizan las raíces con el fin de obtener nutrientes liberados por la raíz en forma de exudados, a la vez que proporcionan metabolitos y disponibilidad de recursos nutritivos, lo que da como resultado el crecimiento y la protección contra patógenos (Yuan *et al.*, 2015). Las plantas determinan la composición biológica del suelo atrayendo microorganismos benéficos, que a su vez, ayudan a la planta mediante la producción de compuestos antimicrobianos contra microorganismos patógenos o inducción del sistema de resistencia en la planta (Farrar *et al.*, 2014). La interacción en la rizosfera entre microorganismos y plantas puede inducir algunas características de la fisiología vegetal. La adición de PGPR y hongos micorrizos en los medios de cultivo puede mejorar la fisiología y los rendimientos de las plantas porque sirven como

promotores del crecimiento, supresores de la enfermedad de las plantas, mejora de la adquisición de nutrientes o producción de reguladores hormonales vegetales. (Beneduzi, 2012). Se han reportado estudios que muestran los efectos de PGPR para aliviar el estrés abiótico, como el estrés oxidativo salino (Islam *et al.*, 2014), frío / escalofriante, sequía y tolerancia a los metales pesados (Nadeem, 2014), y las tensiones bióticas. Algunos patógenos están presentes en el suelo, entre ellos hongos, nematodos y oomicetos. Los microorganismos beneficiosos contribuyen a controlar los patógenos del suelo, compitiendo por los nutrientes y el espacio, sintetizando varios metabolitos y enzimas hidrolíticas que actúan contra la mayoría de las especies patógenas, limitando en algún grado su dispersión y crecimiento (Hibbing *et al.*, 2010). La competencia no sólo se limita a la microflora sino también contra las plantas (Jones *et al.*, 2013). La forma en que los microorganismos beneficiosos en el microbioma actúa es induciendo la respuesta sistémica, las bacterias y hongos promotores del crecimiento en las plantas, para mejorar la defensa contra una amplia gama de patógenos e insectos herbívoros; algunos de los microorganismos que inducen este mecanismo son especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* y micorrizas (Pieterse *et al.*, 2014). Por ejemplo, principalmente *Pseudomonas* spp no patógena, induce una respuesta similar a SAR contra *Botrytis cinerea* en plantas de vid (Verhagen *et al.*, 2010). Los mecanismos mencionados anteriormente conducen a microorganismos benéficos a servir como agentes de biocontrol contra el riesgo de presentar varias enfermedades en la raíz de la planta causadas por microbios patógenos transmitidos por el suelo que interactúan en la rizósfera. (Van Bruggen, 2014).

La asimilación de nutrientes es crítica para las plantas que viven en suelos pobres, debido a la menor resiliencia en los sistemas de producción como consecuencia de décadas de intensificación agrícola. La inoculación de microorganismos beneficiosos a los medios de crecimiento puede conducir a una práctica sostenible para aumentar la aptitud de las plantas y, a su vez, a la reducción de contaminantes sintéticos, incluyendo fertilizantes, pesticidas y herbicidas. Los microorganismos beneficiosos en el proceso de simbiosis han desarrollado la capacidad de facilitar la absorción de macro así como de microelementos a las plantas (Kumar

*et al.*, 2015). Las micorrizas son otros microorganismos beneficios que mantienen la asociación con las raíces de las plantas. La gran mayoría de las plantas, 80 especies y 92% de las familias mantienen asociaciones mutualistas con micorrizas, siendo las micorrizas arbusculares las más predominantes (Wang y Qiu, 2006). La micorriza arbuscular provoca cambios en la fisiología de partes distantes de la planta, provocando cambios a nivel químico, por ejemplo, en hojas (Schweiger y Müller, 2015); mientras que la planta libera compuestos que determinan las características de la rizosfera cambiando la composición microbiana y de los nutrientes (Huang *et al.*, 2014). Algunas de las características fisicoquímicas de rizosfera que tienen una influencia directa en la absorción de nutrientes son la estructura del suelo, el pH y la temperatura (Dotaniya y Meena, 2015). Los exudados de las raíces de las plantas y los cambios en la influencia del pH en la disponibilidad de fósforo, las plantas pueden hacer este elemento disponible acidificando la rizósfera (Hunter *et al.*, 2014). PGPR también puede producir enzimas para convertir los complejos inorgánicos P (fitato) a fosfato ésteres (Gerke, 2015). En lo que respecta al nitrógeno, las micorrizas arbusculares juegan un papel importante aumentando la toma de este microelemento. El nitrógeno (N) es absorbido por los hongos como nitrógeno inorgánico, y posteriormente es absorbido por las raíces como aminoácido (Bücking, y Kafle, 2015). La fijación biológica, la conversión de N<sub>2</sub> atmosférico en amonio (NH<sub>3</sub>) es el resultado de la asociación simbiótica de leguminosas por especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, incluso la posibilidad de simbiosis en nonlegumes ha sido explorada (Mus *et al.*, 2016).

#### **2.4.4 Interacción planta- planta**

Las plantas liberan compuestos orgánicos volátiles en el medio ambiente, que son recibidos por plantas vecinas y tienen un efecto en su crecimiento, reproducción y sobrevivencia (Niederbacher *et al.*, 2015). Las plantas inducen respuestas de defensa liberando compuestos orgánicos volátiles, derivados del metabolismo secundario, en plantas vecinas lo que es conocido como resistencia mediada por VOC (Heil y Karban, 2010, Stenberg *et al.*, 2016). Los compuestos volátiles, tienen la capacidad de inhibir el establecimiento de otras especies

mediante la inhibición de la aparición de semillas, la cooperación de otras especies hermanas también aseguran la resistencia contra herbívoros (Karban *et al.*, 2013). Sin embargo, las especies genéticamente no relacionados también se benefician, compitiendo con el emisor en el reconocimiento de VOCs (Heil y Adame-Álvarez, 2010). Los VOCs pueden utilizarse como una alternativa a los productos químicos utilizados para el control de plagas y enfermedades y con un bajo grado de toxicidad. La comunicación también se establece a través de redes de micorrizas comunes subterráneas, transfiriendo nutrientes de una planta que es rica en recursos naturales, sirviendo como una fuente (donante), al receptor de la planta. Las señales de estrés derivadas del ataque herbívoro, son transportadas a través de la red de micorrizas más rápidamente de las plantas lesionadas a las plantas sanas (Gorzelak, 2015). Para una correcta y efectiva comunicación planta-planta es esencial la concentración y la relación de mezcla de VOCs individuales o en mezclas y la distancia entre plantas (Ueda, 2012). Para asegurar una polinización exitosa, las plantas liberan VOCs, que pueden atraer polinizadores (Stenberg *et al.*, 2016). Otros enemigos naturales pueden ser atraídos hacia el sitio donde se encuentra el huésped, ya sea plantas o herbívoros (Hatano *et al.*, 2015). Debido a que los insectos alteran el perfil volátil en las plantas, causando la liberación de compuestos volátiles específicos (Abraham, 2015). Los estímulos relacionados con la infección herbívora son detectados específicamente por sus respectivos enemigos herbívoros como los parasitoides y los insectos depredadores (Muroi, 2011). Después del reconocimiento de los VOCs por el huésped, no se observan diferencias inmediatas en el sistema de defensa, hasta que los herbívoros ataquen a la planta huésped, mostrando una respuesta más rápida y fuerte conocida como priming (Muroi, 2011). En términos de implicaciones agrícolas, los VOCs como sistemas de comunicación pueden ser útiles en el manejo de plagas, ya que estos compuestos alertan a las plantas huésped de un peligro inminente.

Existe una amplia gama de compuestos que comprenden compuestos fenólicos, terpenoides, furanoacetilenos, glicoalcaloides esteroideos, compuestos que contienen azufre e indoles. En las plantas, las vías del ácido shikímico y el fenilpropanoide son las principales fuentes de metabolitos secundarios requeridos para la vigilancia, ayudando a reducir el riesgo de



enfermedades. Estos compuestos juegan un papel crítico en el desarrollo de la planta, por ejemplo, se producen en el néctar y el polen, sido atractivos de flores, con implicaciones para la reproducción de plantas en la agricultura. Aunque las plantas se aprovechan de los insectos como polinizadores son potencialmente tóxicos en los tejidos vegetativos. Los compuestos sintetizados por la planta después de un ataque de patógenos poseen también actividades fitotóxicas y antimicrobianas. Los patógenos sufren cambios diversos que les permiten infectar variedades de plantas resistentes o desarrollar resistencia a los fungicidas, este proceso se ve afectado por la acción del cambio climático que les lleva a aumentar su distribución y evolucionar rápidamente, aumentando su diversidad (Chakraborty, 2014).

#### **2.4.5 ADN homólogo**

El ADN es una molécula esencial para los organismos que poseen la información para la vigilancia. Como consecuencia de la evolución, las células son capaces de detectar varias sustancias derivadas de patógenos o huéspedes, liberadas cuando hay un daño, incluido el ADN (Hornung y Latz, 2010). La importancia de esta molécula para discernir la diferencia entre el yo y el no reconocimiento de sí, lo lleva a actuar de la mejor manera según sus posibilidades. Hormesis explica que una célula cuando se expone a altos niveles de compuestos tóxicos sufre inhibición, mientras que en niveles bajos pasa por una respuesta adaptativa (Calabrese, 2009). Recientemente, los estudios han demostrado el efecto de inhibición del ADN homólogo fragmentado al azar extracelular en plantas de una manera dependiente de la dosis en comparación con el ADN heterólogo (Mazzoleni *et al.*, 2014; Mazzoleni *et al.*, 2015). Con base en lo anterior, debe suponerse que el ADN extracelular desempeña una función de Factor de Modificadores Metabólicos, actuando particularmente como DAMPs, a ciertas dosis bajas del compuesto. Seguramente aquellas secuencias <1000 pb son una firma muy específica para que cada especie sea reconocida como propia por la planta, de modo que el ADN heterólogo no muestra el mismo efecto. Este nuevo descubrimiento abre nuevas oportunidades al explotar las mejores características del auto-ADN en ambas industrias agropecuarias y farmacológicas,

como productos inhibidores altamente específicos de la especie, limitando el efecto para las otras especies (Mazzoleni *et al.*, 2014). Como paso siguiente es necesario probar si el ADN-homólogo posee un efecto de estimulación en dosis bajas. Una de las principales ventajas es el uso del auto-ADN como elicitores bióticos en las plantas, induciendo maquinaria de defensa y, como resultado, todos los subproductos vegetales.

## 2.5 Xenohormesis

La xenohormesis es un proceso que explica cómo las plantas producen compuestos que inducen un efecto adaptativo a los animales que los consumen, observando el mismo efecto inducido en las plantas cuando se induce la hormesis (Qi, 2013). Las plantas tienen la capacidad de sintetizar fitobioactivos que confieren diferentes actividades biológicas (Sing, 2013). Dentro de los compuestos que sintetiza la planta derivados del metabolismo secundario son los terpenos, fenoles y compuestos que contienen nitrógeno y azufre (Mazid, 2011). Los polifenoles son todos los metabolitos secundarios derivados exclusivamente de la vía de ácido shikímico, fenilpropanoides y de los policetidos, son compuestos que comparten más de un anillo fenólico y no poseen en su estructura algún grupo funcional que contenga nitrógeno. Los fenólicos son uno del principal grupo de metabolitos secundarios de las plantas, incluyendo más de 9.000 compuestos diferentes (Wakiewicz, 2012). La vía del ácido shikímico participa en la síntesis de los metabolitos secundarios y se divide en dos partes precorismato y prefenano. La primera consiste en siete pasos metabólicos que convierten el fosfoenol piruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (E-4-P) a corismato dando lugar a 3 aminoácidos (fenilalanina, tirosina y triptófano) que son precursores de los metabolitos secundarios (Mobin, 2014). La enzima más importante que participa en esta vía es fenilalaninamonioliasa (PAL). Los compuestos fenólicos son los más importantes por su actividad como antioxidantes (Viacava *et al.*, 2014), antimutagénicas (Frassinetti *et al.*, 2015), anticancerígenas (Bailon-Moscoso *et al.*, 2015), entre otras. La manera en que actúan estos compuestos en el organismo es mediante la modulación de la señalización y vías de energía sensibles, el estrés oxidativo y los procesos relacionados con la inflamación, funcionalidad

mitocondrial, maquinaria epigenética, acetilación de histonas y procesos dependientes de la membrana (Barrajón-Catalán *et al.*, 2014). De todos los compuestos sintetizados por las plantas los grupos químicos principales que tienen potenciales efectos sobre la salud son la promoción de los fenólicos, flavonoides, alcaloides, carotenoides, fitoesteroles, taninos, terpenos y saponinas (Jain y Kumar, 2013). A estos compuestos se les denomina nutraceuticos: "compuestos bioactivos de origen natural que se encuentran en los alimentos, suplementos dietéticos y productos a base de hierbas, y tienen promoción de la salud, prevención de enfermedades o propiedades medicinales" (Mondello, 2013). Cuando son adicionados a otros alimentos les confieren actividad nutraceutica confirmando beneficios a la salud además de la nutrición básica, por tanto poseen las actividades biológicas que los nutraceuticos les brindan.

**Cuadro 2.** Efecto de diferentes elicitores bióticos en respuestas de defensa de plantas.

Respuesta	Especie	elicitores bióticos	Referencias
Producción de ROS en Arabidopsis y cerrar estomas	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Elicitor proveniente de levaduras	(Khokon <i>et al.</i> , 2010)
Respuesta contra acaros <i>Phytoseiulus macropilis</i> (Banks)	Género <i>Fragaria</i>	Tetranychid mites (Acari: Phytoseiidae: Tetranychidae)	(Fadini <i>et al.</i> , 2010)
Inducción de las respuestas de defensa contra <i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Qutosan, SA, JA	(Mandal <i>et al.</i> , 2013)
Resistencia contra patógenos <i>Pseudomonas syringae</i> pv. y <i>Myzus persicae</i> ,	<i>Cucumis sativus</i> L. cv. Backdadagi	3-pentanol y 2-butanona	(Song <i>et al.</i> , 2013)
Reducción de la severidad de enfermedades caudadas por <i>Pseudomonas syringae</i> pv. DC3000	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Compuestos volátiles (VOCs) de <i>Ampelomyces</i> sp., y <i>Cladosporium</i> sp.	(Naznin <i>et al.</i> , 2014)
Incremento en el contenido de glucosinatos	Género Brassicaceae	Metil Jasmónico (MeJA), Acido jasmónico (JA), Ácido salicílico (SA)	(Baenas <i>et al.</i> , 2014)
Increment de los niveles de monoterpenos y sesquiterpenos	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Rhizophagus intraradices</i> <i>Beauveria bassiana</i>	(Shrivastava <i>et al.</i> , 2015)
Producción de Diosgenin	<i>Trigonella foenum-graecum</i> (Fenugreek) Seedlings	MeJA	(Chaudhary <i>et al.</i> , 2015)
Actividad antimicrobina contra patógenos	<i>Capsicum chinense</i>	Peróxido de hidrógeno	(Vargas-Hernandez <i>et al.</i> , 2016)
Síntesis de compuestos fenolicos	<i>Catharanthus roseus</i>	Ethylene y MeJA	(Liu <i>et al.</i> , 2016)

Inducción de vías relacionadas a estrés	<i>Oryza sativa</i> spp. <i>japonica</i> cv. Nipponbare	Proteína hipersensitiva MoHrip2 <i>Magnaporthe oryzae</i> 2	(Khan <i>et al.</i> , 2016)
--	--	--	--------------------------------

---

## 2.6 Principales grupos de investigación

**Cuadro 3.** Principales grupos de investigación alrededor del mundo.

<b>Investigador</b>	<b>Tema</b>	<b>Lugar</b>	<b>Año</b>
<b>Dr. Edward J. Calabrese</b>	Hormesis	University of Massachusetts USA	<b>1998</b>
<b>Dr. David Sinclair</b>	Xenohormesis	Harvard Medical School USA	<b>2003</b>
<b>Dr. Martín Heil</b>	Compuestos volátiles	CINVESTAV, México	<b>2005</b>
<b>Dr. Stefano Mazzoleni</b>	Homolog DNA	University of Naples Federico II Italia	<b>2014</b>

### III. METODOLOGÍA

A lo largo de este capítulo se presenta la metodología necesaria para cumplir con el objetivo de la tesis; asimismo se muestran los resultados del estudio que nos permitirán comprobar la hipótesis propuesta.

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Material Químico

(+)-catequina, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, ácido p-cumárico, quercetina, nearingenina, kaempferol, rutina, reactivo Folin, persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ), ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)), DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), Vainillina,  $Na_2CO_3$ , HCl, KCl, metanol, DMSO (Dimetilsulfoxido), medio PDA, medio caldo soya tripticaseina, agar base sangre kanamicina, ampicilina, todos los reactivos descritos anteriormente fueron adquiridos por J.T. Baker y Sigma-Aldrich.

##### 3.2 Material Biológico

*Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Aspergillus niger*, *Clavibacter michiganensis* *Escherichia coli*, *Capsicum annuum*. Los hongos fueron proporcionados por INIFAP campo experimental Bajío. Las bacterias se obtuvieron de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

### 3.1.2 Determinación los métodos adecuados de extracción de elicitors bióticos bióticos

Los elicitors bióticos bióticos que se van a estudiar en el presente trabajo son derivados de plantas, hongos y bacterias; dentro de los hongos y bacterias se analiza el efecto de un hongo patógeno y un no patógeno para la planta; mientras que en las plantas se estudia el DNA homólogo y los extractos acuosos de las hojas. A continuación se presentan los procedimientos de extracción.

#### 3.2.1 Preparación de elicitors bióticos a base de hongos

Los elicitors se prepararon a partir de cultivos de hongos fitopatógenos cultivados en cajas Petri con PDA a 25°C en la oscuridad por 7 días. Posteriormente los hongos se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 250 de caldo papa dextrosa y agitado a 100 rpm a 30°C por 14 días en oscuridad. La suspensión se llevó a la autoclave a 1.04 kg/cm<sup>2</sup>, 121°C por 20 min. Posteriormente se centrifugaron y se filtraron a través de un papel filtro Whatman no.1. La muestra obtenida se liofilizó por 48 h, después se procedió a moler en un mortero. Las muestras ya secas se almacenaron a 4°C hasta su posterior utilización. Las suspensiones en agua destilada se realizaron a las siguientes concentraciones: 0.0, 125, 250, 500, 750, 1000 mg/l (Parshuram, 2011).

#### 3.2.2 Preparación de elicitors bióticos a base de bacterias

Las cepas bacterianas, se activaron en medio caldo soya tripticaseína por 24 h a 37°C. Después se estriaron en agar soya tripticaseína y se incubó por 24 h a 37°C. Por último, se aisló una clona y se realizó un traspaso a medio agar base sangre, nuevamente se incubaron por 24 h a 37°C (NCCLS, 1997). Las cepas crecidas se guardaron en refrigeración hasta su posterior uso. Se pasó una asada a 50 ml de caldo de cultivo nutritivo en un Erlenmeyer y se incubó por 24 h a 27 °C bajo agitación a 120 rpm. Se procedió al lavado de las cepas en agua destilada con ayuda de la centrifuga 10 000 g 15 min. Las bacterias se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm con la ayuda de diluyente de peptona. Posteriormente las cepas fueron homogenizadas y se pasaron al autoclave



a 1.04 kg/cm<sup>2</sup>, 121°C por 20 min; de esta suspensión la concentración para ser utilizados como elicitores bióticos será de 1x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>5</sup>, 1x10<sup>6</sup>, 1x10<sup>7</sup>, 1x10<sup>8</sup> y 1x10<sup>9</sup> UFC.

### **3.2.3 Extracción y fragmentación del DNA homólogo**

La extracción del DNA se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Gilbert & Dupont (2011) con algunas modificaciones. Brevemente:

1. Se molió el chile con nitrógeno líquido hasta pulverizar.
1. Se añadió en un tubo eppendorf de 50 ml 3 g de muestra, 10 ml CTAB y 180 µl de lisozima.
2. Se incubó a 37 C por 30 min en agitación constante.
3. Se añadió 2 ml de SDS (10 % peso/volumen) y 55 µl de proteinasa K (20 mg/ml), dejando incubar por 2 horas en agitación constante.
4. Posteriormente se añadió 10 ml de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) a un pH de 8 mezclando suavemente. Se centrifugaron los tubos eppendorf a 1500xg por 5 minutos.
5. Se añadió otro volumen de 10 ml de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se mezcló suavemente y se centrifugó a 1500xg por 5 minutos.
6. Se añadió 10 ml de cloroformo isoamílico (24:1), se mezcló suavemente y se centrifugó por 5 minutos a 1500 xg.
7. Se decantó la fase acuosa a un tubo estéril y se le añadió 0.5 vol. de 7.5 M de acetato de amonio, se mezcló y se añadió 2.5 vol. de etanol puro. Se mezcló y se dejó precipitar toda la noche a -20 C.
8. Se centrifugó a 10 000 x g por 30 minutos a 4 C y se decantó el etanol.
9. Se añadió 20 ml de etanol 80 %, se mezcló y se centrifugó a 10 000xg por 20 minutos a 4 C, se decantó el etanol.
10. Repetir el paso anterior.

11. Decantar el etanol y dejar los tubos invertidos por 15 minutos para evaporar los restos de etanol.

12. Resuspender en 500 µl de agua estéril. Conservar a -80 C.

Posteriormente se confirmó la presencia de ADN genómico mediante un gel de electroforesis y se cuantificó por espectrofotometría. Se midió la absorbancia a 260 y 280 nm y se calculó la

Concentración de ADN con la fórmula:

$$[\text{ADN}]\mu\text{g/ml} = \text{Abs}_{260} \cdot \text{F actor de dilución} \cdot \text{Coeficiente de extinción (50 para ADN)}$$

Para realizar la fragmentación, se hizo la disolución de las muestras hasta llegar a una concentración de 400, 300, 200, 100, 50, 10 ng/ml de DNA homólogo. Posteriormente estos tubos se les aplico ultrasonido con un sonotrodo a las siguientes condiciones:

Potencia: 0W

C: 10% (aprox. un pulso por segundo)

Amplitud 50%

Tiempo: 30 min

### **3.2.4 Preparación de extractos de plantas**

Se recolectaron hojas jóvenes del cultivo de chile pimiento, se lavaron, secaron y se molieron en una licuadora a una concentración de 2.5, 5, 10, 15, 25 y 50% peso/volumen en agua destilada.

### 3.3 Determinación del incremento de la hormesis en *Capsicum annuum* al aplicar los elicitores bióticos en precosecha

#### 3.3.1 Establecimiento del cultivo

El cultivo de chile pimiento se estableció en un invernadero localizado en la empresa Marquesado de Guadalupe, en el mpio. El Marqués, Querétaro. A los 3 meses después del trasplante en invernadero (tiempo recomendado para cosecha de fruto con la variedad de pimiento a emplear), se procedió a realizar la aplicación de los diferentes elicitores bióticos por aspersion a los frutos de chile, una vez cosechados los pimientos fueron empacados al vacío y se congelaron con nitrógeno líquido, se guardaron a -80°C hasta su posterior utilización.

#### 3.3.2 Diseño de experimentos

La aplicación de los elicitores bióticos a las plantas de chile pimiento consistió en un diseño de experimentos completamente al azar, los tratamientos de elicitores bióticos consistieron en *A. niger*, *P. capsici*, *C. michiganensis*, *E. coli* y *Capsicum annuum* a diferentes niveles y 3 repeticiones como se muestra en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Diseño de experimentos.

Tratamiento	Clave	elicitores bióticos	Concentración	Repeticiones
1	AN1	<i>A. niger</i>	0.1 g/ml	3
2	AN2		0.25 g/ml	3
3	AN3		0.5 g/ml	3
4	AN4		1 g/ml	3
5	AN5		2.5 g/ml	3
6	AN6		5 g/ml	3
7	AN7		10 g/ml	3
8	PC1	<i>P. capsici</i>	0.1 g/ml	3
9	PC2		0.25 g/ml	3
10	PC3		0.5 g/ml	3
11	PC4		1 g/ml	3
12	PC5		2.5 g/ml	3

13	PC6		5 g/ml	3
14	PC7		10 g/ml	3
15	EC1	<i>E. coli</i>	1x10 <sup>4</sup> UFC	3
16	EC2		1x10 <sup>5</sup> UFC	3
17	EC3		1x10 <sup>6</sup> UFC	3
18	EC4		1x10 <sup>7</sup> UFC	3
19	EC5		1x10 <sup>8</sup> UFC	3
20	EC6		1x10 <sup>9</sup> UFC	3
21	CM1	<i>C. michiganensis</i>	1x10 <sup>4</sup> UFC	3
22	CM2		1x10 <sup>5</sup> UFC	3
23	CM3		1x10 <sup>6</sup> UFC	3
24	CM4		1x10 <sup>7</sup> UFC	3
25	CM5		1x10 <sup>8</sup> UFC	3
26	CM6		1x10 <sup>9</sup> UFC	3
27	DNA1	<i>C. annuum</i>	10 ng/l	3
28	DNA2	(DNA)	50 ng/l	3
29	DNA3		100 ng/l	3
30	DNA4		200 ng/l	3
31	DNA5		300 ng/l	3
32	DNA6		400 ng/l	3
33	EX1	<i>C. annuum</i>	2.5 g/l	3
34	EX2	(Extracto)	5 g/l	3
35	EX3		10 g/l	3
36	EX4		25 g/l	3
37	EX5		100 g/l	3
38	EX6		200 g/l	3
39	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	Peróxido de	10 mM	3
40	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	hidrógeno	20 mM	3
41	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3		40 mM	3
42	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 4		80 mM	3
43	Control			3

### 3.3.3 Elaboración de los extractos metanólicos

Los chiles fueron molidos en una licuadora con hielo seco y se guardaron las muestras hasta su posterior análisis.

La extracción de los compuesto se llevó a cabo mediante el método de maceración, empleando como solvente metanol en una relación 1:10 materia fresca y metanol respectivamente, de acuerdo a previos reportes en nuestro grupo con fines de evaluar actividades biológicas (Veloz-García *et al.*,

2010; Feregrino-Pérez *et al.*, 2011).

### **3.3.4 Análisis del contenido de fenoles totales**

Los compuestos fenólicos totales se determinaron según el método propuesto por Folin- Ciocalteu (Dewanto *et al.* 2003). Brevemente en viales se colocaron, 40 µl de la muestra, se adiciono 460 µl de agua destilada y se oxidaron con 250 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (1 N), después de 5 min se adicionaron 1.25 ml de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% para neutralizar, se incubo por 2 h sin agitación. En una placa de 96 pozos se adicionaron 200 µL de cada muestra o metanol (blanco). La curva de calibración se preparó a partir de una solución estándar de ácido gálico (0.1mg/ml) y se tomaron volúmenes de 0 a 160 µl con intervalos de 20 µl y se completó a un volumen de 500 µl con agua destilada. Se midió la absorbancia contra el blanco a 760 nm en un lector de microplaca Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA). Las concentraciones se reportaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por ml de extracto.

### **3.3.5 Análisis del contenido de flavonoides**

La determinación de flavonoides se determinó por método descrito por Liu *et al.*, (2002) utilizando como estándar rutina. La curva de calibración consistió en una solución de rutina a las siguientes concentraciones: 0, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 µg/ml. Para el ensayo en una placa de 96 pozos se colocaron 50 µL de cada una de las muestras, posteriormente se adicionó 200 µl de una solución de 2-aminodifenilborato al 1%, como blanco se utilizó metanol. La absorbancia se determinó a 404 nm en un lector de microplaca Versa Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA). Las concentraciones se reportaron como miligramos equivalentes de rutina por ml de extracto.

### **3.1.3.6 Análisis del contenido de taninos condensados**

El método que se utilizó es el de (+)-catequina-vainillina. Para la curva de calibración se utilizó una solución de catequina a 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/ml. En una placa de 96 pozos se colocaron 50 µl de cada muestra, se adicionó 200 µL de una solución 1:1 de HCl 8%- Vainillina 1%, como blanco se utilizó metanol y se lee a una  $\lambda$  492 nm en un MULTISKAN.

### **3.3.7 Perfil metabólico**

El análisis de compuestos , se realizó mediante un HPLC sistema Waters 600 HPLC-DAD, equipado con un muestreador automático Waters 717 plus y un detector UV/Vis Waters 2487 (Milford, MA, USA). Separación en columna capilar fase reversa Phenomenex ODS-C18. La fase móvil: ácido fórmico-agua 1:99 v/v y acetonitrilo. Análisis metabolómico basado en GC-MS cromatógrafo de gases Agilent 7890<sup>a</sup> acoplado a un detector de masas cuadrupolo Agilent 5975C con una columna capilar HP-5MS.

### **3.3.8 Elaboración de microarreglos para la identificación del perfil de expresión de transcritos**

Se realizó la extracción de ARN de acuerdo a la metodología de TRIZOL®.

1. Se pulverizó de 50 a 100 mg de muestra en presencia del nitrógeno líquido, en morteros totalmente estériles.
2. Se colectó las muestras en tubos eppendorf.
3. Se homogenizó las muestras (congeladas con nitrógeno líquido) con 1 ml del reactivo TRIZOL por cada 50-100 mg de tejido empleado.
4. Se incubó las muestras homogenizadas a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Se centrifugó las muestras homogenizadas a 12 000 rpm durante 15 min a 4°C
6. Se transfirió el sobrenadante (fase acuosa) a un tubo nuevo e incubar a temperatura ambiente

5 minutos.

7. Se agregó 200 µl de cloroformo por 1 ml de TRIZOL empleado.

8. Se agitó vigorosamente por inversión del tubo 15 segundos e incubó nuevamente de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.

9. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El ARN permaneció exclusivamente en la fase acuosa.

10. Se transfirió la primera fase (la fase acuosa) a un tubo nuevo y se precipitó el ARN con 500 µl de alcohol isopropílico por cada mililitro de TRIZOL consumido, mezclar por inversión e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

11. Se centrifugó a 12 000 rpm y 4°C por 10 minutos. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet (RNA) con 1 ml de etanol al 75% por cada mililitro de TRIZOL utilizado, mezclar con vórtex y centrifugar a 7 500 rpm durante 5 minutos a 4 °C.

12. Se dejó secar el ARN por no más de 10 minutos y disolver en agua libre de RNasas. Se calentó 10 minutos a 55-60°C y transfirió inmediatamente a hielo. El ARN se almacenó a -70°C para evitar su degradación

Posteriormente, las muestras de ARN fueron hibridadas en el Instituto de Medicina Genómica de acuerdo a su protocolo para su posterior procesamiento en la elaboración de microarreglos. Los microarreglos fueron elaborados por Affimetrix sobre el GeneChip Tomato Genome Array™ número 900739.

### 3.4 Determinación del potencial nutracéutico o de xenohormesis

Para determinar el potencial nutracéutico de los compuestos contenidos en el fruto de chile se utilizaron el método del ABTS y DPPH.

#### 3.4.1 Actividad antioxidante (ABTS)

Este ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Nenadis *et al.*, (2004). Para la curva estándar se utilizó una solución de Trolox a una concentración de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800  $\mu$ molar. Para generar el radical ABTS<sup>•+</sup> se preparó una solución stock de ABTS 7 mM se tomaron 5 ml de la solución acuosa, se le adicionaron 88  $\mu$ l de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 140 mM y se almacenó en oscuridad por 12 h. Después la solución que contiene el radical se midió a una  $\lambda = 734$  nm y se diluyó en etanol (de 20 a 25 ml) hasta que el valor de la absorbancia alcanzó un valor menor a 1.0. Posteriormente se prepararon las muestras en una placa de 96 pozos: al blanco se le adiciona a 20  $\mu$ l de la muestra y 230  $\mu$ l de etanol, para los controles se adicionó 20  $\mu$ l de metanol (C1) y agua destilada (C2), finalmente se les adicionó 230  $\mu$ l de ABTS<sup>•+</sup>. La medición de la absorbancia se llevó a cabo a los 730 nm por un lapso de 0-6 min.

#### 3.4.2 Actividad antioxidante (DPPH)

El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos, primero se adicionaron: 20  $\mu$ l de los extractos y posteriormente se adicionó 200  $\mu$ l de DPPH al 80% de metanol, para el control positivo se utilizó Trolox y para el negativo todos los reactivos a excepción de los extractos. Se mide la absorbancia de 520 nm a diferentes tiempos (0, 4, 10, 30, 60, 90 y 120 min). Los resultados se reportaron como % ARA (Capacidad antiradical).



### **3.5 Análisis estadístico**

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con el paquete estadístico STATGRAPHICS® Centurion XV.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Determinación los métodos adecuados de extracción de elicitors bióticos

Se evaluaron las mejores condiciones de producción de los elicitors bióticos a continuación se presentan los resultados para hongos (Cuadro 5) y bacterias (Cuadro 6). Para la aplicación de los hongos como elicitors en los cultivos es necesario tomar en cuenta rendimiento, facilidad de operación y costo. Las condiciones que se presentan a continuación son las mejores tomando en cuenta lo anterior. Para *P. capsici* el mejor medio de crecimiento fue medio PDB en comparación con caldo V8. Se creció a temperatura ambiental y a 27°C, siendo mejor la primera. Por último, el tratamiento sin agitación nos permitió recuperar el micelio mientras que con agitación se tuvo más problemas debido a que el crecimiento micelial se fragmentó y fue más difícil su filtración. En condiciones sin agitación la concentración de oxígeno disuelto era de 50 mg/l.

**Cuadro 5.** Condiciones de crecimiento para los hongos

Condiciones ambientales	<i>P. capsici</i>	<i>A. niger</i>
Temperatura	Ambiental	27°C
Concentración de oxígeno disuelto	50 mg/l	100mg/l
Ph	5.5-6	5.5
Iluminación	Oscuridad	Oscuridad
Agitación	Sin agitación	150 rpm
Tiempo	2 semanas	72h

*E. coli* es un microorganismo el cual su crecimiento está bien estandarizado dentro del laboratorio. Por lo tanto, de esta bacteria se siguieron las condiciones de crecimiento estándar y se procedió a hacer las curvas de crecimiento para calcular la concentración.

Por otro lado, para *C. michiganensis* se probó el medio LB, B de King y NBY, a pesar de que

en todos los medios de cultivo la bacteria creció, fue mejor el medio NBY. La temperatura evaluada para su crecimiento fue 37°C y 26°C centígrados, observándose crecimiento a 26°C. La concentración de UFC a las 24 h de crecimiento fue  $1 \times 10^9$  para *E. coli* y  $1 \times 10^8$  para *C. michiganensis*.

**Cuadro 6.** Condiciones de crecimiento para las bacterias.

<b>Condiciones ambientales</b>	<b><i>C. michiganensis</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>
Temperatura	26°C	37°C
Medio de crecimiento	NBY	LB
Ph	6-7	6-7
Iluminación	Oscuridad	Oscuridad
Agitación	150 rpm	150 rpm
Tiempo	24h	24h

En el Cuadro 7 se presenta el rendimiento total de los microorganismos, como se observa para los hongos *A. niger* fue el que presentó mayor rendimiento en con 1.5 a 2 g/l en comparación con *P. capsici* donde se observa un rendimiento de 0.1 a 0.5 g/l. Para las bacterial el mejor rendimiento se observó para *E. coli* con  $1 \times 10^9$  UFC en comparación con *C. michiganensis* en la cual se reportó una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC. Lo anterior puede ser debido a que el medio de *C. michiganensis* presento en el medio.

**Cuadro 7.** Rendimiento de hongos y bacterias.

<b><i>Microorganismo</i></b>	<b><i>Rendimiento</i></b>	<b><i>Total</i></b>
<i>P. capsici</i> *	0.1-0.5 g/l	8 g
<i>A. niger</i> *	1.5-2 g/l	10 g
<i>C. michiganensis</i>	$1 \times 10^8$ UFC	1 l
<i>E. coli</i>	$1 \times 10^9$ UFC	1 l

\*Peso seco

## 4.2 Determinación del incremento de la hormesis en *Capsicum annuum* al aplicar los elicitors bióticos en precosecha

A continuación, se muestran los resultados de la cantidad de metabolitos secundarios bajo el efecto de los elicitors bióticos. Se puede observar que en todos los tratamientos la concentración más alta de elicitor no se traduce en mayor cantidad de fenoles, flavonoides y taninos. Los mejores tratamientos para AN, PC, EC, CM, ADN, EX y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para fenoles y extracto fueron: 488.667<sup>a</sup>, 502.222<sup>a</sup>, 590.167<sup>a</sup>, 491.667<sup>a</sup>, 551.889<sup>a</sup>, 477.889<sup>a</sup>, 494.222<sup>a</sup> (GAE) / g extracto respectivamente. La concentración de fenoles de mayor a menor de los mejores tratamientos sería la siguiente: EC>ADN>PC>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>>CM>AN>EX, todos los mejores tratamientos presentaron mayor cantidad de fenoles en comparación con el control cuyo valor es 384.556<sup>ab</sup> (GAE) / g extracto.

En lo que respecta a los flavonoides, los mejores tratamientos para AN, PC, EC, CM, ADN, EX y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para fenoles y extracto fueron: 0.0263<sup>a</sup>, 0.0304<sup>a</sup>, 0.0299<sup>a</sup>, 0.0317<sup>a</sup>, 0.0297<sup>a</sup>, 0.0221<sup>ab</sup>, 0.0358<sup>a</sup> (RUE) / g extracto respectivamente. La concentración de fenoles de mayor a menor de los mejores tratamientos sería la siguiente: EX>CM>PC>EC>ADN>AN>EX, todos los mejores tratamientos presentaron mayor cantidad de fenoles en comparación con el control cuyo valor es 0.0249<sup>a</sup> (RUE) /g extracto.

Por último, para los taninos los mejores tratamientos para AN, PC, EC, CM, ADN, EX y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para fenoles y extracto fueron: 0.9835<sup>a</sup>, 0.7832<sup>a</sup>, 0.9399<sup>a</sup>, 1.2596<sup>a</sup>, 1.1579<sup>a</sup>, 0.9124<sup>a</sup>, 0.8914<sup>a</sup> (CE) / g extracto respectivamente. La concentración de fenoles de mayor a menor de los mejores tratamientos sería la siguiente: CM>ADN>AN>EC>EX>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>>PC, todos los mejores tratamientos presentaron mayor cantidad de fenoles en comparación con el control cuyo valor es 0.7606<sup>ab</sup> (CE) / g. A pesar de que los mejores tratamientos son mejores que el control en el contenido de fenoles, flavonoides y taninos, no todos ellos son mayores que el control.

También se puede notar que la síntesis de fenoles, flavonoides y taninos no necesariamente sea mayor en un tratamiento en específico, ello quiere decir que los diferentes tratamientos sintetizan

de manera diferencial los compuestos, presentándose mayor cantidad en uno y menor cantidad en otros. Por otro lado la cantidad de elicitor y la cantidad de compuestos ni }o sigue una tendencia lineal positiva, sin embargo eso se discutirá más adelante.

**Cuadro 8.** Cantidad de fenoles, flavonoides y taninos de extractos de chile.

Tratamiento	Clave	Fenoles*	Flavonoides**	Taninos***
1	AN1	337.556 <sup>b</sup>	0.0228 <sup>a</sup>	0.4715 <sup>bc</sup>
2	AN2	392.333 <sup>ab</sup>	0.0257 <sup>a</sup>	0.3326 <sup>c</sup>
3	AN3	340 <sup>b</sup>	0.0249 <sup>a</sup>	0.6847 <sup>ab</sup>
4	AN4	434 <sup>ab</sup>	0.0263 <sup>a</sup>	0.9835 <sup>a</sup>
5	AN5	349.444 <sup>b</sup>	0.0254 <sup>a</sup>	0.2632 <sup>c</sup>
6	AN6	416.444 <sup>a</sup>	0.0262 <sup>a</sup>	0.5765 <sup>bc</sup>
7	AN7	488.667 <sup>a</sup>	0.0287 <sup>a</sup>	0.5749 <sup>bc</sup>
	CONTROL	384.556 <sup>ab</sup>	0.0249 <sup>a</sup>	0.7606 <sup>ab</sup>
8	PC1	382.667 <sup>ab</sup>	0.0304 <sup>a</sup>	0.3456 <sup>a</sup>
9	PC2	463.444 <sup>a</sup>	0.0272 <sup>ab</sup>	0.7218 <sup>a</sup>
10	PC3	318.889 <sup>b</sup>	0.0252 <sup>ab</sup>	0.6185 <sup>a</sup>
11	PC4	502.222 <sup>a</sup>	0.0276 <sup>ab</sup>	0.5345 <sup>a</sup>
12	PC5	410.889 <sup>a</sup>	0.0280 <sup>ab</sup>	0.7832 <sup>a</sup>
13	PC6	446 <sup>a</sup>	0.0268 <sup>ab</sup>	0.4925 <sup>a</sup>
14	PC7	356.333 <sup>b</sup>	0.0219 <sup>b</sup>	0.3125 <sup>a</sup>
	CONTROL	384.556 <sup>ab</sup>	0.0249 <sup>ab</sup>	0.7606 <sup>a</sup>
15	EC1	590.167 <sup>a</sup>	0.0240 <sup>a</sup>	0.9399 <sup>a</sup>
16	EC2	486.333 <sup>abc</sup>	0.0226 <sup>a</sup>	0.4384 <sup>bcd</sup>
17	EC3	404.333 <sup>bc</sup>	0.027 <sup>a</sup>	0.1857 <sup>d</sup>
18	EC4	509 <sup>ab</sup>	0.0299 <sup>a</sup>	0.4651 <sup>bc</sup>
19	EC5	488.667 <sup>abc</sup>	0.0229 <sup>a</sup>	0.7009 <sup>ab</sup>
20	EC6	492.167 <sup>abc</sup>	0.027 <sup>a</sup>	0.3246 <sup>cd</sup>
	CONTROL	384.556 <sup>c</sup>	0.0249 <sup>a</sup>	0.7606 <sup>a</sup>
21	CM1	491.667 <sup>a</sup>	0.0238 <sup>b</sup>	0.7679 <sup>b</sup>
22	CM2	406.333 <sup>a</sup>	0.0257 <sup>b</sup>	0.6976 <sup>b</sup>

23	CM3	407.5 <sup>a</sup>	0.0263 <sup>b</sup>	1.2596 <sup>a</sup>
24	CM4	439.667 <sup>a</sup>	0.0317 <sup>a</sup>	0.6734 <sup>ab</sup>
25	CM5	384 <sup>a</sup>	0.0253 <sup>b</sup>	0.2987 <sup>b</sup>
26	CM6	484 <sup>a</sup>	0.0276 <sup>ab</sup>	0.2939 <sup>b</sup>
8	CONTROL	384.556 <sup>a</sup>	0.0249 <sup>b</sup>	0.7606 <sup>b</sup>
27	DNA1	551.889 <sup>a</sup>	0.0297 <sup>a</sup>	1.0432 <sup>a</sup>
28	DNA2	422.778 <sup>a</sup>	0.0282 <sup>a</sup>	1.1579 <sup>a</sup>
29	DNA3	438.833 <sup>a</sup>	0.0249 <sup>ab</sup>	0.7485 <sup>ab</sup>
30	DNA4	351 <sup>a</sup>	0.0251 <sup>ab</sup>	0.7428 <sup>ab</sup>
31	DNA5	421.667 <sup>a</sup>	0.0274 <sup>a</sup>	0.4198 <sup>b</sup>
32	DNA6	384.889 <sup>a</sup>	0.0185 <sup>b</sup>	0.4215 <sup>b</sup>
	CONTROL	384.556 <sup>a</sup>	0.0249 <sup>ab</sup>	0.7606 <sup>ab</sup>
33	EX1	477.889 <sup>a</sup>	0.0135 <sup>d</sup>	0.3391 <sup>c</sup>
34	EX2	475 <sup>a</sup>	0.0220 <sup>ab</sup>	0.3779 <sup>c</sup>
35	EX3	448.667 <sup>a</sup>	0.0175 <sup>cd</sup>	0.5983 <sup>abc</sup>
36	EX4	408.889 <sup>ab</sup>	0.0221 <sup>ab</sup>	0.6330 <sup>abc</sup>
37	EX5	331.333 <sup>b</sup>	0.0191 <sup>bc</sup>	0.5377 <sup>bc</sup>
38	EX6	397.111 <sup>ab</sup>	0.0195 <sup>bc</sup>	0.9124 <sup>a</sup>
	CONTROL	384.556 <sup>ab</sup>	0.0249 <sup>a</sup>	0.7606 <sup>ab</sup>
39	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	415.222 <sup>a</sup>	0.0263 <sup>a</sup>	0.3504 <sup>b</sup>
40	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	425 <sup>a</sup>	0.0208 <sup>a</sup>	0.7073 <sup>ab</sup>
41	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	494.222 <sup>a</sup>	0.0275 <sup>a</sup>	0.8914 <sup>a</sup>
42	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 4	399.889 <sup>a</sup>	0.0358 <sup>a</sup>	0.5830 <sup>ab</sup>
43	CONTROL	384.556 <sup>a</sup>	0.0249 <sup>a</sup>	0.7606 <sup>ab</sup>

Concentración de fenoles expresada en mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g extracto

Concentración de Flavonoides en mg equivalentes de (+)-rutina (RUE)/g extracto

Concentración de Taninos en mg equivalentes de (+)-catequina (CE)/g extracto

Los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes  $\pm$  SD. Las letras indican la diferencia significativa entre los tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ).

### 4.3 Determinación del potencial nutracéutico o de xenohormesis

La capacidad antioxidante se realizó por medio de la prueba de ABTS y DPPH, como Trolox (TE)/10 g de extracto, inhibición (% de actividad antiradical) respectivamente a continuación se muestran los resultados. La capacidad antioxidante es resultado de la cantidad de metabolitos secundarios. Se puede observar en el cuadro 8 se muestra que la capacidad antioxidante por el método de DPPH para los tratamientos AN, PC, EC, CM, DNA, EX y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son 68.0804<sup>a</sup>, 78.6602<sup>a</sup>, 86.0904<sup>a</sup>, 90.8801<sup>a</sup>, 51.6565<sup>a</sup>, 48.7727<sup>a</sup>, 46.1052<sup>a</sup> % de actividad antiradical. Todos los mejores tratamientos de cada elicitor biótico es mayor en comparación con el control, el cual reporta 39.3149<sup>bc</sup> % de actividad antiradical. Se observa también la capacidad antioxidante de mayor a menor de los mejores tratamientos como sigue: CM>EC>PC>AN>DNA>EX>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta misma tendencia se observa para los metabolitos secundarios.

Por otro lado, en lo que respecta a la capacidad antioxidante medida por el método de ABTS se muestra que los tratamientos AN, PC, EC, CM, DNA, EX y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son 5.0133<sup>ab</sup>, 6.96103<sup>a</sup>, 6.85564<sup>a</sup>, 5.19821<sup>a</sup>, 4.25179<sup>a</sup>, 5.52821<sup>a</sup>, 5.05769<sup>a</sup> μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto. Todos los mejores tratamientos de cada elicitor biótico es mayor en comparación con el control, el cual reporta 4.22641<sup>a</sup> μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto.

La capacidad antioxidante entre el método del DPPH y ABTS presentan diferencias entre tratamientos. Estas diferencias pueden estar dadas por el mecanismo de acción del radical ABTS y DPPH ya que es diferente. Muchos de los tratamientos mostrarán menor actividad antioxidante por los dos métodos en comparación con el control, este efecto se vio claramente para los compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y taninos totales. Como se sabe existen más de 15000 compuestos derivados del metabolismo secundario en plantas los cuales tienen diferente capacidad antioxidante por eso se observan diferencias entre las técnicas.

**Cuadro 9.** Capacidad antioxidante de extractos de Chile.

<b>Tratamiento</b>	<b>Clave</b>	<b>DPPH*</b>	<b>ABTS**</b>
1	AN1	44.402 <sup>abc</sup>	4.8482 <sup>ab</sup>
2	AN2	68.0804 <sup>a</sup>	3.8905 <sup>ab</sup>
3	AN3	35.8634 <sup>c</sup>	5.0133 <sup>ab</sup>
4	AN4	60.3934 <sup>abc</sup>	4.8723 <sup>ab</sup>
5	AN5	66.3006 <sup>ab</sup>	3.7553 <sup>b</sup>
6	AN6	66.3817 <sup>ab</sup>	4.9297 <sup>ab</sup>
7	AN7	63.9215 <sup>ab</sup>	5.2248 <sup>a</sup>
	CONTROL	39.3149 <sup>bc</sup>	4.2264 <sup>ab</sup>
8	PC1	59.8076 <sup>ab</sup>	4.47718 <sup>bc</sup>
9	PC2	66.9764 <sup>a</sup>	6.96103 <sup>a</sup>
10	PC3	65.6157 <sup>a</sup>	4.38615 <sup>bc</sup>
11	PC4	78.6602 <sup>a</sup>	4.41436 <sup>bc</sup>
12	PC5	71.4613 <sup>a</sup>	5.09821 <sup>bc</sup>
13	PC6	67.5757 <sup>a</sup>	4.48051 <sup>bc</sup>
14	PC7	35.201 <sup>c</sup>	5.28282 <sup>b</sup>
	CONTROL	39.3149 <sup>bc</sup>	4.22641 <sup>c</sup>
15	EC1	75.3439 <sup>a</sup>	5.57487 <sup>ab</sup>
16	EC2	74.2557 <sup>a</sup>	4.32846 <sup>b</sup>
17	EC3	65.9176 <sup>ab</sup>	6.85564 <sup>a</sup>
18	EC4	86.0904 <sup>a</sup>	4.73821 <sup>b</sup>
19	EC5	71.5724 <sup>a</sup>	4.99128 <sup>b</sup>
20	EC6	72.9783 <sup>a</sup>	5.80744 <sup>ab</sup>
	CONTROL	39.3149 <sup>b</sup>	4.22641 <sup>b</sup>
21	CM1	72.6268 <sup>ab-</sup>	4.75974 <sup>a</sup>
22	CM2	59.0867 <sup>bc</sup>	5.19821 <sup>a</sup>
23	CM3	55.7073 <sup>bc</sup>	5.02231 <sup>a</sup>
24	CM4	70.8492 <sup>ab</sup>	4.73308 <sup>a</sup>
25	CM5	60.7178 <sup>bc</sup>	4.92923 <sup>a</sup>
26	CM6	90.8801 <sup>a</sup>	4.95359 <sup>a</sup>
8	CONTROL	39.3149 <sup>c</sup>	4.22641 <sup>a</sup>



27	DNA1	51.6565 <sup>a</sup>	3.55974 <sup>a</sup>
28	DNA2	49.0656 <sup>a</sup>	4.25179 <sup>a</sup>
29	DNA3	48.4167 <sup>a</sup>	4.10731 <sup>a</sup>
30	DNA4	23.8778 <sup>a</sup>	4.04692 <sup>a</sup>
31	DNA5	34.6828 <sup>a</sup>	3.61231 <sup>a</sup>
32	DNA6	33.8583 <sup>a</sup>	4.00897 <sup>a</sup>
	CONTROL	39.3149 <sup>a</sup>	4.22641 <sup>a</sup>
33	EX1	48.7727 <sup>a</sup>	4.87692 <sup>abc</sup>
34	EX2	47.3489 <sup>ab</sup>	5.05308 <sup>ab</sup>
35	EX3	29.2217 <sup>ab</sup>	5.52821 <sup>a</sup>
36	EX4	45.524 <sup>ab</sup>	5.0741 <sup>ab</sup>
37	EX5	19.1511 <sup>b</sup>	4.10205 <sup>bc</sup>
38	EX6	27.131 <sup>ab</sup>	3.99077 <sup>c</sup>
	CONTROL	39.3149 <sup>a</sup>	4.22641 <sup>a</sup>
39	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	46.1052 <sup>a</sup>	4.23769 <sup>a</sup>
40	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	35.2821 <sup>a</sup>	4.83 <sup>a</sup>
41	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	34.5927 <sup>a</sup>	4.87718 <sup>a</sup>
42	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 4	40.9821 <sup>a</sup>	5.05769 <sup>a</sup>
43	CONTROL	39.3149 <sup>a</sup>	4.22641 <sup>a</sup>

La capacidad antioxidante del DPPH se reporta como porcentaje de inhibición (% de actividad antiradical).

\*\*La capacidad antioxidante del ABTS se reporta como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto.

Una vez obtenidos los datos de la cantidad de metabolitos secundarios y la actividad antioxidante se procedió a determinar la correlación existente entre estos el cual se observa en el cuadro 9.

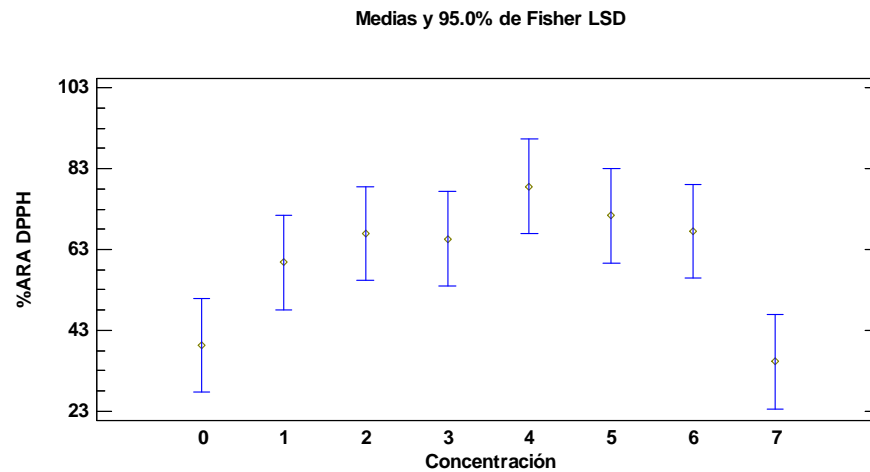
Ninguno de los tratamientos que aquí se presentan tuvo correlación mayor del 0.98, entre las correlaciones más altas se tienen fenoles-flavonoides para el tratamiento de *A. niger* con 0.8104, DPPH y taninos con un 0.9175 para el tratamiento de peróxido de hidrógeno, flavonoides-taninos para el tratamiento de *E. coli* con 0.7487, el tratamiento el cual tuvo casi nula correlación es el del extracto de *C. annuum*.

**Cuadro 10.** Correlación entre los compuestos y la actividad antioxidante de los extractos de Chile.

		Fenoles	Flavonoides	Taninos	DPPH	ABTS
<i>A. niger</i>	Fenoles	1				
	Flavonoides	0.8104	1			
	Taninos	.0476	0.1425	1		
	DPPH	0.3398	0.3198	0.0786	1	
	ABTS	0.0522	0.1661	0.4777	0.199	1
<i>P. capsici</i>	Fenoles	1				
	Flavonoides	0.1618	1			
	Taninos	0.0535	0.0697	1		
	DPPH	0.4423	0.357	0.4259	1	
	ABTS	0.0157	0.0594	0.1596	0.0196	1
<i>E. coli</i>	Fenoles	1				
	Flavonoides	0.446	1			
	Taninos	0.2367	0.7487	1		
	DPPH	0.2037	0.2831	0.0693	1	
	ABTS	0.086	0.1812	0.1318	0.4125	1
<i>C. michiganensis</i>	Fenoles	1				
	Flavonoides	0.0005	1			
	Taninos	0.0051	0.0191	1		
	DPPH	0.066	0.6793	0.3135	1	
	ABTS	0.1079	0.2635	0.0137	0.151	1
<i>C. annuum</i> DNA	Fenoles	1				
	Flavonoides	0.3698	1			
	Taninos	0.4384	0.2374	1		
	DPPH	0.2413	0.6395	0.4185	1	
	ABTS	0.1302	0.3426	0.05448	0.0014	1
<i>C. annuum</i> Extracto	Fenoles	1				
	Flavonoides	0.0779	1			
	Taninos	0.0938	0.2474	1		
	DPPH	0.0002	0.6141	0.3083	1	
	ABTS	0.0016	0.484	0.2083	0.2932	1
Peróxido de hidrógeno	Fenoles	1				
	Flavonoides	0.0666	1			
	Taninos	0.0185	0.594	1		
	DPPH	0.1064	0.4098	0.9175	1	
	ABTS	0.1584	0.0185	0.4818	0.4555	1

Se graficó aquellos tratamientos los cuales presentaron curvas de tipo horméticas de la actividad

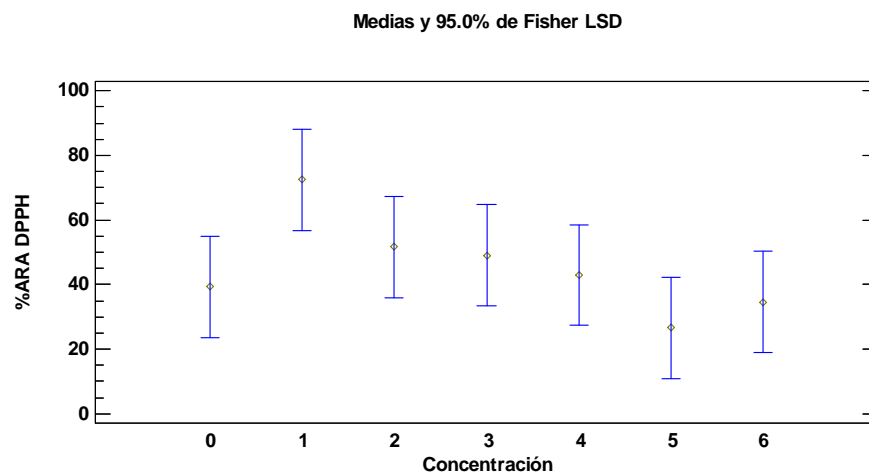
antioxidante ya sea por ABTS o DPPH. Se puede observar que el tratamiento de *P. capsici* en las diferentes concentraciones (0.1 g/ml, 0.25 g/ml, 0.5 g/ml, 1 g/ml, 2.5 g/ml, 5 g/ml, 10 g/ml) induce una curva tipo hormética donde la concentración más alta se alcanza a la concentración 5 que corresponde a 2.5 g/ml de extracto acuoso.



**Figura 2.** Curva de hormesis de los frutos de chile bajo la influencia del elicitores bióticos de *P. capsici*.

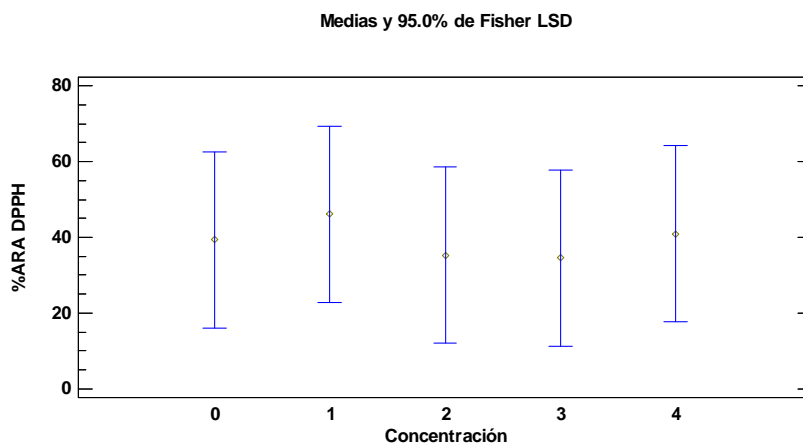
Se puede observar que el tratamiento de DNA homólogo en lo que respecta al DPPH, sigue el mismo modelo de hormesis en las diferentes concentraciones (10 ng/l, 50 ng/l, 100 ng/l, 200 ng/l, 300 ng/l, 400 ng/l) el punto más alto de la curva a la concentración 2 que corresponde a 50 ng/l de extracto acuoso.

Debido a que los tratamientos anteriores siguen una línea tipo hormética en lo que respecta a la actividad antioxidante, se refiere mas bien al potencial hormético.



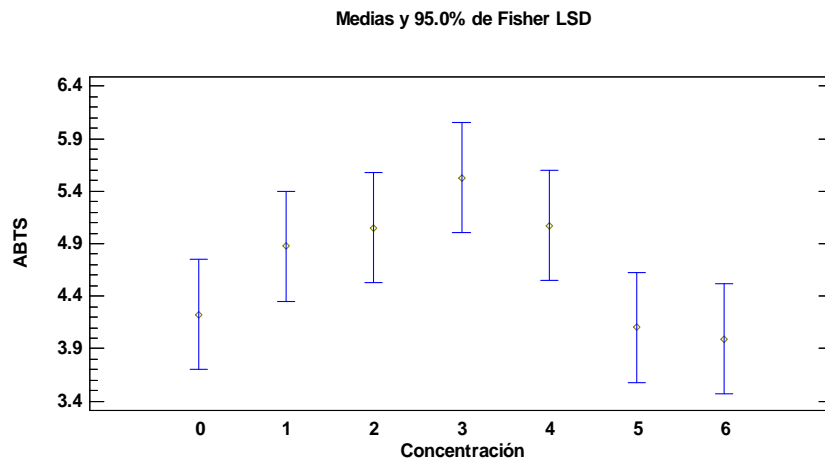
**Figura 3.** Curva de hormesis de los frutos de chile bajo la influencia del elicitores bióticos de DNA homólogo.

Nuevamente el DNA induce una curva tipo hormética en lo que respecta a la xenohormesis. Sin embargo la diferencia entre los tratamientos no es significativa.



**Figura 4.** Curva de hormesis de los frutos de chile bajo la influencia del elicitores bióticos de DNA homólogo.

Podemos nuevamente observar que el tratamiento de *P. capsici* nuevamente muestra una curva tipo hormética, pero ahora para la medición por el método del ABTS. Se puede observar que el tratamiento de *P. capsici* en las diferentes concentraciones (0.1 g/ml, 0.25 g/ml, 0.5 g/ml, 1 g/ml, 2.5 g/ml, 5 g/ml, 10 g/ml) induce una curva tipo hormética donde la concentración más alta se alcanza a la concentración 5 que corresponde a 1 g/ml de extracto acuoso.



**Figura 5.** Curva de hormesis de los frutos de chile bajo la influencia del elicitores bióticos de extracto de *Capsicum annuum*.

## V. CONCLUSIÓN

El manejo adecuado de la hormesis en precosecha del pimiento bajo el efecto de elicitores bióticos de organismos patógenos y no patógenos (PAMPSs, MAMPs) y extractos de la misma planta de *C. annuum* y su DNA homólogo (DAMPs) permite incrementar la cantidad de metabolitos de defensa y su capacidad antioxidantes, muchos de estos tratamientos presentaron una curva tipo hormética por lo cual su aplicación permite establecer un equilibrio entre los potenciales de rendimiento y de xenohormesis.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham J, Giacomuzzi V and Angeli S 2015 Root damage to apple plants by cockchafer larvae induces a change in volatile signals below- and above-ground; *Entomol Exp Appl.* **156** 279-289.
- Achon M A, Serrano L, Sabate J and Porta C 2015 Understanding the epidemiological factors that intensify the incidence of maize rough dwarf disease in Spain; *Ann Appl Biol* **166** 311–320.
- Albert M 2013 Peptides as triggers of plant defence; *J Exp Bot.* **64** 5269-5279.
- Al-Tawaha A R M 2011 Effects of soil type and exogenous application of yeast extract on soybean seed isoflavone concentration; *Int. J. Agric. Biol.* **13** 275–278.
- Alvarez A, Montesano M, Schmelz E and Ponce de León I 2016 Activation of Shikimate, Phenylpropanoid, Oxylipins, and Auxin Pathways in *Pectobacterium carotovorum* Elicitors-Treated Moss; *Front Plant Sci.* **7** 328.
- Antonovics J, Boots M, Ebert D, Koskella B, Poss M and Sadd B M 2013 The origin of specificity by means of natural selection: evolved and nonhost resistance in host-pathogen interactions; *Evolution.* **67** 1-9.
- Aranega-Bou P, de la O Leyva M, Finiti I, García-Agustín P and González-Bosch C 2014 Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model; *Front Plant Sci.* **5** 488.
- Aranega-Bou P, de la O Leyva M, Finiti I, García-Agustín P, González-Bosch C 2014 Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. *Front Plant Sci.* **5** 488.
- Baenas N, García-Viguera C, Moreno D A 2014 Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in *Brassicaceae* sprouts. *J Agric Food Chem.* **62** 1881-1889.
- Bailon-Moscoso N, Romero-Benavides J C, Tinitana-Imaicela F, Ostrosky-Wegman P 2015 Medicinal plants of Ecuador: a review of plants with anticancer potential and their chemical composition. Medicinal Chemistry Research; *Med Chem Res.* **24**.

- Baluška F and Mancuso S 2013 Microorganism and filamentous fungi drive evolution of plant synapses; *Front Cell Infect Microbiol.* **3** 44.
- Barrajón-Catalán E, Herranz-López María, Joven J, Segura-Carretero A, Alonso-Villaverde C, Menéndez J A, Micol V 2014 Molecular promiscuity of plant polyphenols in the management of age-related diseases: far beyond their antioxidant properties. *Advances in experimental medicine and biology.* ISSN: 0065-2598.
- Beckers G J, Jaskiewicz M, Liu Y, Underwood W R, He S Y, Zhang S and Conrath U 2009 *Plant Cell.* **21** 944-953.
- Belz R G and Duke S O 2014 Herbicides and plant hormesis; *Pest Manag Sci.* **70** 698-707.
- Belz R G, Cedergreen N. 2010. Parthenin hormesis in plants depends on growth conditions. *Environ Exp Bot.* **69**, 293–301
- Belz, R.G.; Cedergreen, N. 2010. Parthenin hormesis in plants depends on growth conditions. Belz, R.G.; Cedergreen, N. Parthenin hormesis in plants depends on growth conditions. *Environ Exp Bot.* 2010, 69, 293–301.
- Beneduzi A, Ambrosini A and Passaglia L M 2012 Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents; *Genet Mol Biol.* **35** 1044-51
- Beruski G C, Pereira A B, Jaccoud-Filho D S, Sartori, F F and Sentelhas P C 2016 Effects of Climate and Agricultural Practices on Temporal Progress of *Sclerotinia sclerotiorum* for Soybean in Brazil; *Agr Sci.* **7** 425-438
- Bienert G P and Chaumont F 2014 Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide; *Biochim Biophys Acta.* **1840** 1596-1604
- Bonanomi D, Benfenati F and Valtorta F 2006 Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle; *Prog Neurobiol.* **80** 177-217
- Bücking H and Kafle A 2015 Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Nitrogen Uptake of Plants: Current Knowledge and Research Gaps; *Agronomy.* **5** 587-612.



- Bueter C L, Specht C A and Levitz S M 2013 Innate Sensing of Chitin and Chitosan. *PLoS Pathog.* **9** e1003080
- Calabrese E J 2009 Hormesis: a conversation with a critic. *Environ Health Perspect.* **117** 1339–1343
- Calabrese E J 2014 Hormesis: a fundamental concept in biology; *Microbial Cell.* **1** 145 - 149
- Calabrese E J 2014 Hormesis: from mainstream to therapy; *J Cell Commun Signal.* **8** 289–291
- Calabrese E J and Blain R B 2005 The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview; *Toxicol Appl Pharmacol.* **202** 289–301
- Calabrese E J and Blain R B 2011 The hormesis database: the occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature; *Regul Toxicol Pharmacol.* **61** 73-81
- Calabrese E J and Mattson M P 2011 Hormesis provides a generalized quantitative estimate of biological plasticity; *J Cell Commun Signal.* **5** 25–38
- Chakraborty N, Sim S C, Casler M, Jung g 2014 Development of SCAR marker for the detection of QTL for resistance to dollar spot in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.); *Hortic. Environ. Biotechnol.* **55** 329.
- Chaudhary S, Chikara S K, Sharma M C, Chaudhary A, Alam Syed B, Chaudhary P S, Mehta A, Patel M, Ghosh A, Iriti M 2015 Elicitation of Diosgenin Production in *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) Seedlings by Methyl Jasmonate. *Int J Mol Sci.* **16** 29889–29899
- Cheng Y, Li X, Jiang H, Ma W, Miao W, Yamada T and Zhang M 2012 Systematic analysis and comparison of nucleotide-binding site disease resistance genes in maize; *FEBS J.* **279** 2431-2443
- Cheng Y, Zhang H, Yao J, Wang X, Xu J, Han Q, Wei G, Huang L and Kang Z 2012 Characterization of non-host resistance in broad bean to the wheat stripe rust pathogen; *BMC Plant Biol.* **12** 96
- Conrath U, Beckers G J, Langenbach C J, Jaskiewicz M R 2015 Priming for enhanced defense; *Annu Rev Phytopathol.* **53** 97-119

Costales, D.; Falcón, A.; Nápoles, M.; Winter, J.; Gerbaux, P.; Adrianus Onderwater, R.; Wattiez, R.; Cabrera, J. Effect of Chitosaccharides in Nodulation and Growth in Vitro of Inoculated Soybean. *Am J Plant Sci.* 2015, 7, 1380-1391.

Dave A and Graham I A 2012 Oxylinp Signaling: A Distinct Role for the Jasmonic Acid Precursor cis-(+)-12-Oxo-Phytodienoic Acid (cis-OPDA); *Front Plant Sci.* **3** 42

Dotaniya M L and Meena V D 2015 Rhizosphere Effect on Nutrient Availability in Soil and Its Uptake by Plants: A Review; *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* **85** 1.

Duan C, Yu J, Bai J, Zhu Z and Wang X 2014 Induced defense responses in rice plants against small brown planthopper infestation; *Crop j.* **2** 55–62.

*Environ Exp Bot.* **69**, 3, 293–301.

Fadini M A M, Venzon M, Oliveira H, Pallini A, Vilela E F 2010 Response of the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* (Banks) to volatiles produced by strawberry plants in response to attack by *Tetranychid mites* (Acari: Phytoseiidae: Tetranychidae). *Neotrop Entomol.* **39** 248-252

FAO, 2014

Farrar K, Bryant D and Cope-Selby N 2014 Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions: plant growth promotion in energy crops; *Plant Biotechnol J.* **12** 1193-1206

Flores, F. J., Garzon, C. D. 2012. Detection and assessment of chemical hormesis on the radial growth in vitro of oomycetes and fungal plant pathogens. Dose-Response. ISSN: 1559-3258

Frassinetti S, Gabriele M, Caltavuturo L, Longo V, Pucci L 2015 Antimutagenic and Antioxidant Activity of a Selected Lectin-free Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Two Cell-based Models; *Plant Foods Hum Nutr.* **70** 35-41

Fujikawa T, Sakaguchi A, Nishizawa Y, Kouzai Y, Minami E, Yano S, Koga H, Meshi T and Nishimura M 2012 Surface  $\alpha$ -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants. *PLoS Pathog.* **8** e1002882.

Gao C H, Ren X D, Mason A S, Liu H L, Xiao M L, Li J N and Fu D H 2014 Horizontal gene transfer in plants.; *Funct. Integr. Genomics* **14** 23–29

Gao Q-M, Zhu S, Kachroo P and Kachroo A 2015 Signal regulators of systemic acquired resistance; *Front Plant Sci.* **6** 228

García-Mier L, Guevara-González R G, Mondragón-Olguín V M, Verduzco-Cuellar B D R and Torres-Pacheco I 2013 Agriculture and Bioactives: Achieving Both Crop Yield and Phytochemicals. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 4203-4222

Gerke J 2015 Phytate (Inositol Hexakisphosphate) in Soil and Phosphate Acquisition from Inositol Phosphates by Higher Plants. A Review; *Plants (Basel).* **4** 253-266

Giotis C, Markellou E, Theodoropoulou A, Kostoulas G, Wilcockson S, Leifert C 2012 The effects of different biological control agents (BCAs) and plant defence elicitors on cucumber powdery mildew (*Podosphaera xanthii*). *Org. Agr.* **2** 89-101

Gorzalak M A, Asay A K, Pickles B J, Simard S W 2015 Inter-plant communication through mycorrhizal networks mediates complex adaptive behaviour in plant communities. *AoB Plants.* **7** plv050

Hardoim P R, van Overbeek L S, Berg G, Pirttilä A M, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsche Sessitsch A 2015 The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **79** 293–320

Hasan, S.A.; Irfan, M.; Masrahi, Y.S.; Khalaf M.A.; Hayat. S. Growth, photosynthesis, and antioxidant responses of *Vigna unguiculata* L. treated with hydrogen peroxide. *Cogent Food Agric.* 2016, 2, 1155331.

Hatano E, Saveer A M, Borrero-Echeverry F, Strauch M, Zakir A, Bengtsson M, Ignell R, Anderson P, Becher P G, Witzgall P and Dekker T 2015 A herbivore-induced plant volatile interferes with host plant and mate location in moths through suppression of olfactory signalling pathways; *BMC Biology.* **3** 75

Heil M and Adame-Álvarez R M 2010 Short signalling distances make plant communication a soliloquy; *Biol Lett.* **6** 843-5

- Heil M and Karban R 2010 Explaining evolution of plant communication by airborne signals; *Trends Ecol Evol.* **25** 137-144
- Hibbing M E, Fuqua C, Parsek M R and Peterson S B 2010 Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle; *Nat Rev Microbiol.* **8** 15-25
- Hong, W.; He-Chun, Y.E.; Guo-Feng, L.I.; Ben-Ye, L.; Kang, C. Effects of Fungal Elicitors on Cell Growth and Artemisinin Accumulation in Hairy Root Cultures of *Artemisia annua*. *Acta Bot Sin.* 2000, 42, 905-909.
- Hooper PL, Hooper PL, Tytell M, Vigh L. 2010. Xenohormesis: health benefits from an eon of plant stress response evolution. *Cell Stress Chaperones.* 15(6):761-70.
- Hornung V and Latz E 2010 Intracellular DNA recognition; *Nat Rev Immunol.* **10** 123-30.
- Hossain M A, Bhattacharjee S, Armin S M, Qian P, Xin W, Li H Y, Burritt D J, Fujita M and Tran L S P 2015 Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging; *Front Plant Sci.* **6** 420
- Huang X-F, Chaparro J M, Reardon K F, Zhang R, Shen Q and Vivanco J M 2014 Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities; *Botany.* **92** 267-275
- Hunter P J, Teakle G R and Bending G D 2014 Root traits and microbial community interactions in relation to phosphorus availability and acquisition, with particular reference to Brassica; *Front Plant Sci.* **5** 27
- Iason G 2005 The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivory: ecological perspectives; *Proc Nutr Soc.* **64** 123-131
- Ibarra-Torres, P., Valadez-Moctezumab, E., Pérez-Grajalesb, M., Rodríguez-Camposc, J., Jaramillo-Flores, M.E. 2015 Inter- and intraspecific differentiation of *Capsicum annuum* and *Capsicum pubescens* using ISSR and SSR markers; *Scientia Horticulturae.* **181** 137-146
- Islam F, Yasmeen T, Ali Q, Ali S, Arif M S, Hussain S and Rizvi H 2014 Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress; *Ecotoxicol Environ Saf.* **104** 285-93

- Jail N G, Luiz C, Rocha A C, and Di Piero R M 2014 High-density chitosan reduces the severity of bacterial spot and activates the defense mechanisms of tomato plants; *Trop Plant Pathol.* **39** 434-441
- Jasik, J.; de Klerk G. Effect of Methyl Jasmonate on Morphology and Dormancy Development in Lily Bulblets Regenerated In Vitro. *J Plant Growth Regul.* 2006, 25, 45–51.
- Jaskiewicz M, Conrath U and Peterhänsel C 2011 Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response; *EMBO Reports.* **12** 50-55
- Jimenez-Garcia S N, Vazquez-Cruz M A, Guevara-Gonzalez R G, Torres-Pacheco I, Cruz-Hernandez A and Feregrino-Perez A A 2013 Current Approaches for Enhanced Expression of Secondary Metabolites as Bioactive Compounds in Plants for Agronomic and Human Health Purposes; *Pol J Food Nutr Sci.* **63** 67–78
- Jones D L, Clode P L, Kilburn M R, Stockdale E A and Murphy D V 2013 Competition between plant and bacterial cells at the microscale regulates the dynamics of nitrogen acquisition in wheat (*Triticum aestivum*); *New Phytol.* **200** 796-807
- Jones J D G and Dangl J L 2006 The Plant Immune System; *Nature* **444** 323-329
- Karban R, Yang L H and Edwards K F 2013 Volatile communication between plants that affects herbivory: a meta-analysis; *Ecol Lett.* **17** 44-52
- Kazan K and Lyons R 2014 Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors; *Plant Cell.* **26** 2285-2309
- Khan N U, Liu M, Yang X, Qiu D 2016 Fungal Elicitor MoHrip2 Induces Disease Resistance in Rice Leaves, Triggering Stress-Related Pathways; *PLoS ONE.* **11** e0158112
- Khokon M A, Hossain M A, Munemasa S, Uraji M, Nakamura Y, Mori I C, Murata Y 2010 Yeast elicitor-induced stomatal closure and peroxidase-mediated ROS production in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **51** 1915-1921

- Krumova K and Cosa G 2016 Overview of reactive oxygen species, in singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences. In: Nonell A, Flors C (eds) Singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences. *Roy Soc Chem Lond.* **1** 1–21
- Kumar B L and Gopal D V R S 2015 Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment; *3 Biotech.* **5** 867-876
- Land, Walter G. 2015. “The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases: Part II: DAMPs as Diagnostics, Prognostics and Therapeutics in Clinical Medicine.” Sultan Qaboos University Medical Journal 15.2: e157–e170.
- Li X, Rui J, Xiong J, Li J, He Z, Zhou J, Yannarell A C and Mackie R I 2014 Functional Potential of Soil Microbial Communities in the Maize Rhizosphere; *PLoS ONE.* **9** e112609
- Liu, J.; Liu, Y.; Wang, Y.; Zhang, Z-H.; Zu, Y-G.; Efferth, T.; Tang, Z-H. The Combined Effects of Ethylene and MeJA on Metabolic Profiling of Phenolic Compounds in *Catharanthus roseus* Revealed by Metabolomics Analysis. *Front Physiol.* 2016, 7, 217.
- Mandal S, Kar I, Mukherjee A K, Acharya P 2013 Elicitor-induced defense responses in *Solanum lycopersicum* against *Ralstonia solanacearum*; *Scientific World Journal.* **2013** 561056
- Martinez-Medina A, Flors V, Heil M, Mauch-Mani B, Pieterse C M, Pozo M J, Ton J, van Dam N M and Conrath U 2016 Recognizing Plant Defense Priming; *Trends Plant Sci.* **21** 818-822
- Mattson M P 2008 Hormesis Defined; *Ageing Res Rev.* **7** 1–7
- Mazid M, Khan T, Mohammad F 2011 Effect of abiotic stress on synthesis of secondary plant products: A Critical Review; *Agric. Rev.* **32** 172-182
- Mazzoleni S, Carteni F, Bonanomi G, Incerti G, Chiusano M L, Termolino P, Migliozi A, Senatore M, Giannino F, Rietkerk M, Risitano A and Lanzotti V 2014 New perspectives on the use of nucleic acids in pharmacological applications: inhibitory action of extracellular self-DNA in biological systems; *Phytochem Rev.* **13** 937
- Mazzoleni S, Carteni F, Bonanomi G, Senatore M, Termolino P, Giannino F, Incerti G, Rietkerk M, Lanzotti V and Chiusano M L 2015 Inhibitory effects of extracellular self-DNA: a general biological process?; *New Phytol.* **206** 127-132

Mejía-Teniente L, Durán-Flores F D D, Chapa-Oliver A M, Torres-Pacheco I, Cruz-Hernández A, González-Chavira M M, Ocampo-Velázquez R V and Guevara-González R G 2013 Oxidative and Molecular Responses in *Capsicum annuum* L. after Hydrogen Peroxide, Salicylic Acid and Chitosan Foliar Applications; *Int J Mol Sci.* **14** 10178-10196

Michelmore R W, Christopoulou M and Caldwell K S 2013 Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future; *Annu Rev Phytopathol.* **51** 291-319.

Ming, Q.; Su, C.; Zheng, C.; Jia, M.; Zhang, Q.; Zhang, H.; Rahman, K.; Han, T.; Qin, L. Elicitors from the endophytic fungus *Trichoderma atroviride* promote *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone biosynthesis. *J Exp Bot.* 2013, 64, 5687-5694.

Mondal, M.M.A.; Malek, M.A.; Puteh, A.B. Ismail, M.R. Foliar application of chitosan on growth and yield attributes of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Bangladesh J. Bot.* 2013, 42, 179-183.

Mondello L 2013 Nutraceuticals and separations; *Anal Bioanal Chem.* **405** 4589-90.

Muroi A, Ramadan A, Nishihara M, Yamamoto M, Ozawa R, Takabayashi J and Arimura G 2011 The composite effect of transgenic plant volatiles for acquired immunity to herbivory caused by inter-plant communications; *PLoS One.* **6** e24594.

Mus F, Crook M B, Garcia K, Garcia-Costas A, Geddes B A, Kouri E D, Paramasivan P, Ryu M H, Oldroyd G E, Poole P S, Udvardi M K, Voigt C A, Ané J M and Peters J W 2016 Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes; *Appl Environ Microbiol.* **82** 3698-710

Nadeem S M, Ahmad M, Zahir Z A, Javaid A and Ashraf M 2014 The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments; *Biotechnol Adv.* **32** 429-448.

Naznin H A, Kiyohara D, Kimura M, Miyazawa M, Shimizu M, Hyakumachi M 2014 Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana*; *PLoS One.* **9** e86882

- Newman M-A, Sundelin T, Nielsen J T and Erbs G 2013 MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants; *Front Plant Sci.* **4** 139
- Nicaise V, Roux M, and Zipfel C 2009 Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm; *Plant Physiol.* **150** 1638–1647
- Niederbacher B, Winkler J B and Schnitzler J P 2015 Volatile organic compounds as non-invasive markers for plant phenotyping; *J Exp Bot.* **66** 5385-5387
- O'Brien J A, Daudi A, Butt V S and Bolwell G P 2012 Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism; *Planta.* **236** 765-779
- Occhipinti A 2013 Plant coevolution: evidences and new challenges; *J Plant Interact.* **8** 188-196
- Phukan U J, Jeena G S, Shukla R K 2016 WRKY Transcription Factors: Molecular Regulation and Stress Responses in Plants; *Front Plant Sci.* **7** 760
- Pichersky E and Lewinsohn E 2011 Convergent evolution in plant specialized metabolism; *Annu Rev Plant Biol.* **62** 549-566
- Pieterse C M, Zamioudis C, Berendsen R L, Weller D M, van Wees S C and Bakker P A 2014 Induced systemic resistance by beneficial microbes; *Annu Rev Phytopathol.* **52** 347-375
- Pozo M J, van Der Ent S, van Loon L C and Pieterse C M 2008 Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*; *New Phytol.* **180** 511-523
- Pradhan P, Fischer G, van Velthuisen H, Reusser D E, Kropp J P 2015 Closing Yield Gaps: How Sustainable Can We Be?; *PLoS ONE.* **10** e0129487
- Pusztahelyi T, Holb I J and Pócsi I 2015 Secondary metabolites in fungus-plant interactions; *Front Plant Sci.* **6** 573
- Qi H, Li L, Yu J 2013 [Xenohormesis: understanding biological effects of traditional Chinese medicine from an evolutionary and ecological perspective]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **38** 3388-94.



- Rahman T A, Oirdi M E, Gonzalez-Lamothe R and Bouarab K 2012 Necrotrophic pathogens use the salicylic acid signaling pathway to promote disease development in tomato; *Mol Plant Microbe Interact.* **25** 1584-1593
- Ramakrishna A and Ravishankar G A 2011 Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants; *Plant Signal Behav.* **6** 1720-1731
- Rich M K, Schorderet M and Reinhardt D 2014 The role of the cell wall compartment in mutualistic symbioses of plants. *Front Plant Sci.* **5** 238
- Salitxay, T.; Phouthaxay, P.; Pang, Y.G.; Yeong, Y.C.; Adhikari, P.B.; Park, C.H. Effects of Elicitors on Seedling Growth, Total Polyphenol and Chlorophyll Content and Antioxidant Activity of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Crop Sci.* 2016, 61, 33-40.
- Schenke D, Böttcher C and Scheel D 2011 Crosstalk between abiotic ultraviolet-B stress and biotic (flg22) stress signalling in *Arabidopsis* prevents flavonol accumulation in favor of pathogen defence compound production; *Plant Cell Environ.* **34** 1849-1864
- Schweiger R and Müller C 2015 Leaf metabolome in arbuscular mycorrhizal symbiosis; *Curr Opin Plant Biol.* **26** 120-126
- Sewelam N, Kazan K and Schenk P M 2016 Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. *Front Plant Sci.* **7** 187
- Shrivastava G, Ownley B H, Augé R M, Toler H, Dee M, Vu A, Köllner T G, Chen F 2015 Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect; *Symbiosis.* **65** 65–74.
- Singh A A, Agrawal S B, Shahi J P, Agrawal M 2013 Assessment of growth and yield losses in two *Zea mays* L. cultivars (quality protein maize and nonquality protein maize) under projected levels of ozone; *Environ Sci Pollut Res Int.* **21** 2628 2641
- Song G C, Ryu C-M 2013 Two Volatile Organic Compounds Trigger Plant Self-Defense against a Bacterial Pathogen and a Sucking Insect in Cucumber under Open Field Conditions. *Int J Mol Sci.* **14** 9803-9819
- Stenberg J A, Heil M, Åhman I and Björkman C 2015 Optimizing Crops for Biocontrol of Pests and Disease; *Trends Plant Sci.* **20** 698-712

- Strugala R, Delventhal R and Schaffrath U 2015 An organ-specific view on non-host resistance; *Front Plant Sci.* **6** 526
- Tateda C, Zhang Z, Shrestha J, Jelenska J, Chinchilla D and Greenberg J T 2014 Salicylic Acid Regulates Arabidopsis Microbial Pattern Receptor Kinase Levels and Signaling; *The Plant Cell.* **26** 4171-4187
- Tavares, L.C.; Rufino, C.A.; Oliveira, S.; Brunes, A.P.; Villela, F.A. Treatment of rice seeds with salicylic acid: seed physiological quality and yield. *J. Seed Sci.* 2014, 36, 352-356.
- Thakur M and Sohal B S 2013 Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review; *ISRN Biochem.* **2013** 762412.
- Trdá L, Boutrot F, Claverie J, Brulé D, Dorey S and Poinssot B 2015 Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline; *Front Plant Sci.* **6** 219
- Tuteja N and Mahajan S 2007 Calcium Signaling Network in Plants: An Overview; *Plant Signal Behav.* **2** 79-85
- Ueda H, Kikuta Y and Matsuda K 2012 Plant communication: Mediated by individual or blended VOCs?; *Plant Signaling Behav.* **7** 222-226
- Van Bruggen A H C, Francis I M and Jochimsen K N 2014 Non-pathogenic rhizosphere bacteria belonging to the genera *Rhizorhapis* and *Sphingobium* provide specific control of lettuce corky root disease caused by species of the same bacterial genera; *Plant Pathol.* **63** 1384–1394
- Vargas-Hernandez M, Torres-Pacheco I, Gautier F, Álvarez-Mayorga B, Cruz-Hernández A, García-Mier L, Jiménez-García S N, Ocampo-Velázquez R V, Feregrino-Perez A A, Guevara-Gonzalez R G 2016 Influence of Hydrogen Peroxide Foliar Applications on *in vitro* Antimicrobial Activity in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Biosyst.* **2016** 1-7.
- Veloso J and Díaz J 2012 *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defence genes; *Plant Pathol.* **61** 281-288

- Verhagen B W, Trotel-Aziz P, Couderchet M, Höfte M and Aziz A 2010 *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine; *J Exp Bot.* **61** 249-260
- Veyrat N, Robert C A M, Turlings T C J and Erb M 2016 Herbivore intoxication as a potential primary function of an inducible volatile plant signal; *J Ecol.* **104** 591–600
- Viacava G E, Roura S I, Agüero M V 2014 Antioxidant activity of butterhead lettuce: evaluation of significant factors affecting antioxidant extraction and quantification; *Journal of Food Measurement and Characterization.* **9** 206-214
- Vos I A, Pieterse C M J and van Wees S C M 2013 Costs and benefits of hormone-regulated plant defences; *Plant Pathol.* **62** 43–55
- Wang B and Qiu Y L 2006 Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants; *Mycorrhiza.* **16** 299-363
- Whitehead S R and Poveda K 2011 Herbivore-induced changes in fruit–frugivore interactions; *J Ecol.* **99** 964 – 969
- Wiesel L, Newton A C, Elliott I, Booty D, Gilroy E M, Birch P R J and Hein I 2014 Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection; *Front Plant Sci.* **5** 655
- Wiktorowska, E.; Długosz, M.; Janiszowska, W. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enz Microb Technol.* 2010, 46, 14–20.
- Wodniok S, Brinkmann H, Glöckner G, Heidel A J, Philippe H, Melkonian M and Becker B 2011 Origin of land plants: do conjugating green algae hold the key?; *BMC Evol Biol.* **11** 104
- Xu J, Meng J, Meng X, Zhao Y, Liu J, Sun T, Liu Y, Wang Q and Zhang S 2016 Pathogen-Responsive MPK3 and MPK6 Reprogram the Biosynthesis of Indole Glucosinolates and Their Derivatives in *Arabidopsis* Immunity; *Plant Cell.* **28** 1144-1162

Yuan J, Zhang N, Huang Q, Raza W, Li R, Vivanco J M and Shen Q 2015 Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Sci Rep.* **5** 13438

Zhang L, Du L and Poovaiah B W 2014 Calcium signaling and biotic defense responses in plants; *Plant Signal Behav.* **9** e973818