

SIGUIENDO LA PISTA

Potencial de las infusiones de ortiga (*Urtica dioica* L.) para proteger a la alubia común (*Phaseolus vulgaris* L.) de la enfermedad de la grasa

Carlota Cerezo Antón¹, Penélope García Angulo² y María Luz Centeno Martín²

- ¹ Graduada en Biología por la Universidad de León. ccerea00@estudiantes.unileon.es
- ² Área de Fisiología Vegetal, Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Universidad de León, 24071 León, España. pgara@unileon.es, mlcenm@unileon.es

Resumen

El empleo de preparados basados en plantas que sustituyan a los fitosanitarios químicos es un reto para la agricultura sostenible. Las suspensiones acuosas (Us) de ortiga (*Urtica dioica* L.) son un candidato pues el tratamiento con Us de plantas de alubia común (*Phaseolus vulgaris* L.) redujo los síntomas de la enfermedad de la grasa causada por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) (De la Rubia *et al.*, 2022). Sin embargo, el uso de Us como producto agrícola final entraña ciertos problemas. El objetivo del presente trabajo fue comprobar si las infusiones de ortiga (Uin) tienen el mismo efecto y, en caso afirmativo, conocer a qué tipo de actividad podría deberse: antimicrobiana, promotora de las defensas naturales de la planta y/o antioxidante. Para ello, se hicieron ensayos de crecimiento de Pph en presencia de Uin, de liberación de H₂O₂ en respuesta a flagelina en discos foliares preincubados con Uin y de estimación de la capacidad antioxidante de Uin. Los resultados apuntan a que las propiedades protectoras de la infusión se deben al contenido en compuestos bioactivos antioxidantes. Además, se probó que el pretratamiento de las plantas con Uin disminuía el daño oxidativo foliar provocado tras 6 horas de infección con Pph, lo que refuerza esta idea.

Palabras clave

Agricultura sostenible, daño oxidativo, estrés biótico, *Pseudomonas syringae*

Introducción

Los cultivos se encuentran sometidos en el campo a múltiples factores de estrés abiótico y biótico que repercuten negativamente en la producción y el rendimiento agrícola (Verma *et al.*, 2013). En concreto, los agentes de estrés biótico están representados por las malas hierbas, los herbívoros, los insectos plaga

consumidores de plantas y los fitopatógenos (bacterias, hongos y virus causantes de enfermedades). El método principal para su control consiste en aplicar fitosanitarios químicos, pero su uso incorrecto puede tener efectos adversos en la producción vegetal y entrañar riesgos para la salud humana y el medio ambiente. Con el fin de minimizar tales efectos, y a la par garantizar una producción alimentaria sostenible, la Comisión Europea estableció en la Estrategia “de la granja a la mesa” y en la Estrategia sobre la biodiversidad (Ministerio de Derechos Sociales y Agenda 2030) la reducción en un 50 % del uso de plaguicidas y fertilizantes químicos en agricultura para el 2030.

Una alternativa a los fitosanitarios químicos son los agentes de biocontrol. Se trata de preparaciones a base de microorganismos, compuestos bioactivos o materiales derivados de plantas (van Lenteren, 2012) que, aplicados a los cultivos, evitan y/o previenen el ataque de los agentes de estrés biótico. Específicamente, los preparados a base de plantas (PBPs) deben su efecto protector a la presencia de compuestos con distintas actividades, entre los que destacan: a) las fitoalexinas y los alcaloides con propiedades antimicrobianas, que protegen directamente a las plantas frente a los fitopatógenos, b) los flavonoides y fenoles, compuestos antioxidantes capaces de proteger a las plantas frente al estrés oxidativo general y c) algunos oligosacáridos derivados de la pared celular que activan mecanismos de defensa naturales de las plantas, entre los que se encuentran a su vez la síntesis de sistemas antioxidantes y de metabolitos secundarios (Zaynab *et al.*, 2018). Así pues, la producción de PBPs que protejan a los cultivos puede ser clave en la agricultura sostenible.

Por otro lado, las plantas presentan *per se* mecanismos naturales de defensa frente al ataque por un patógeno. Durante los primeros momentos tras la infección, las plantas son capaces de percibir su presencia mediante receptores transmembrana que reconocen patrones moleculares muy conservados, como la flagelina 22 (flg22), propia del flagelo de bacterias como *Pseudomonas*, o la quitina, propia de la pared celular de hongos (Zipfel y Oldroyd, 2017). Tras este reconocimiento, las células de las plantas producen una fuerte liberación de H₂O₂ y una entrada de calcio intracelular, lo cual activa una cascada de transducción de señales que desencadena en la expresión de numerosos genes de defensa de la planta (Couto y Zipfel, 2016). Se ha comprobado que la aplicación de algunos fragmentos de paredes celulares del patógeno o de la propia planta (Tarkowski *et al.*, 2019), así como algunos análogos estructurales de hormonas, como el ácido 2,6-dicloroisonicotínico, también desencadenan esta producción de H₂O₂ y la posterior activación de las defensas sin producir enfermedad (De la Rubia *et al.*, 2021).

En el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de León se trabaja desde hace años en el diseño de PBPs capaces de proteger a las plantas frente a fitopatógenos y en el estudio de su composición y actividad, para lo cual se utilizan distintos patosistemas como modelos experimentales. Uno de ellos es el formado por la alubia común (*Phaseolus vulgaris* L.) y la bacteria hemibiótrofa

Pseudomonas syringae pv *phaseolicola* (Pph). El patógeno es el responsable de la enfermedad de la grasa en variedades susceptibles como la Riñón, que pertenece a la Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Judías de la Bañeza-León”, y causa importantes pérdidas económicas en Castilla y León, donde se produce el 50 % de la alubia nacional.

El patosistema Pph-alubia Riñón se utilizó en un estudio sobre la capacidad de cuatro PBPs para promover respuestas de defensa en las plantas. Los resultados indican que uno de ellos, basado en suspensiones de hojas de ortiga (*Urtica dioica* L.), inhibía el crecimiento *in vitro* de Pph. Además, activaba los sistemas de defensa en las plantas dado que éstas mostraban menos síntomas de la enfermedad si se trataban con el PBP antes de la infección con el patógeno (De la Rubia *et al.* 2022). Por lo tanto, las suspensiones de ortiga podrían ser un buen candidato a producto final con aplicaciones agrícolas, pero la presencia de partículas en suspensión hace que la distribución sea poco homogénea, lo cual podría dar lugar a resultados variables tras su aplicación. Además, dichas partículas hacen difícil su aplicación ya que pueden obturar boquillas, tuberías, etc. haciéndolas inviables como tal. Una solución sería utilizar infusiones de ortiga clarificadas, lo que evitaría estos problemas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, **el objetivo de este trabajo** fue comprobar si la infusión de hoja de ortiga (Uin) tiene un efecto protector sobre la infección con Pph en la alubia Riñón. Además, se pretende estudiar si la infusión tiene actividad bacteriostática o bactericida, si es capaz de promover respuestas primarias de defensa en las plantas y/o si tiene propiedades antioxidantes. Para ello se realizaron: 1) bioensayos de crecimiento *in vitro* de Pph en presencia de Uin; 2) ensayos de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en discos de hoja de alubia pretratados con Uin frente a discos no pretratados; 3) ensayos de la capacidad antioxidante de Uin, así como del daño oxidativo causado por la infección con Pph en plantas de alubia pretratadas con Uin y plantas control.

Materiales y Métodos

Preparación de la infusión de ortiga

Los materiales utilizados para realizar este trabajo fueron cedidos por De la Rubia *et al.* (2022). Procedían de plantas de ortiga en estado vegetativo ubicadas cerca de la localidad de Callejo de Ordás (León). Las hojas se cosecharon en mayo de 2018, se secaron en estufa a 60 °C y se trituraron dando lugar a un pulverizado, que se empleó en la elaboración del PBP. Primero se mezclaron diferentes cantidades (mg) del pulverizado en distintos volúmenes (mL) de agua destilada. Después, las mezclas se autoclavaron y centrifugaron. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes y se filtraron para obtener las infusiones (Uin).

Bioensayo de crecimiento de Pph en presencia de infusión de ortiga (Uin)

La bacteria *Pseudomonas syringae* van Hall 1902, CECT321 (Pph) se creció en medio líquido King's B (KB) durante 2 días a 30 °C y en agitación a 220 rpm.

Las placas para los bioensayos se prepararon con concentraciones 1, 4, 10 y 20 mg-equivalentes/L de Uin en medio TSA (Tryptic-Casein Soy Agar) con glucosa (0,5 % p/V) autoclavado a 121 °C durante 15 min. Se utilizaron además placas control con medio TSA sin PBP. Cuando el medio se gelificó, se hizo un agujero en el centro de las placas donde se incorporaron 20 µL del inóculo de Pph en NaCl 0,9 % (p/V) a una densidad de cultivo aproximada de 10^8 unidades formadoras de colonias CFU/mL, que se corresponde con la fase exponencial de crecimiento de la bacteria. Las placas se incubaron en una estufa a 30 °C durante 7 días. Finalmente, se hicieron fotografías de las placas y se estimó el área del halo de crecimiento de Pph utilizando el software ImageJ. Se calculó el crecimiento de la bacteria como el porcentaje del área del halo medida en presencia de Uin respecto al área del halo en ausencia de PBP.

Estimación del H_2O_2 liberado por discos foliares de alubia tratados con Uin

Para realizar este experimento se utilizaron plantas de alubia crecidas *in vitro*. Las semillas de *P. vulgaris* variedad Riñón se esterilizaron con etanol al 70 % (V/V) 30 s seguido de NaClO 0,4 % (p/V) 20 min. Tras lavarlas cuatro veces con agua estéril, se sembraron en una mezcla turba:perlita (sustrato universal Blumenerde) hidratada y contenida en recipientes de vidrio de 980 mL (Phytolab) cerrados y esterilizados. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 °C, fotoperiodo de 16 h de luz y $45 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de intensidad lumínica.

Los discos foliares se extrajeron de las hojas cotiledonares de 8 plantas de alubia de 14 días, se colocaron en los pocillos de una placa blanca con 200 µL/pocillo de agua estéril (columnas 1 y 2, pre H_2O) o de Uin (columnas 3 y 4, preUin) y se dejaron incubando toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se realizó la reacción que permite estimar la producción de ROS, entre ellas H_2O_2 , en los discos foliares en respuesta a flg22, un mimético de la infección por Pph. Primero, se retiró el agua y la infusión de los pocillos y después se añadieron 100 µL/pocillo de la solución de reacción con luminol 20 µM y peroxidasa tipo VI.A 100 µg/mL. La placa se incubó 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se añadieron entonces 100 µL/pocillo de agua en las columnas 1 (discos pre H_2O + H_2O , control) y 3 (discos preUin+ H_2O) o de flg22 2 µM en las columnas 2 (discos pre H_2O +flg22, control positivo del experimento) y 4 (discos preUin+flg22). La luminiscencia emitida por el luminol, en caso de sufrir peroxidación en presencia del H_2O_2 liberado por los discos, se midió en un lector de placas durante 2 h.

Medida de la capacidad antioxidante de la infusión de ortiga

La capacidad antioxidante de Uin se estimó por el método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) descrito por Benzie y Strain (1996) y modificado para realizarse en placas de 96 pocillos. El ensayo se basa en la reducción del complejo TPTZ-Fe³⁺ (2,4,6-tri-(2-piridil)-s-triazina) a su forma ferrosa, a pH ácido. El resultado de la reacción es un producto cuya concentración se puede cuantificar midiendo la densidad óptica (DO) a 593 nm y utilizando una recta de calibración (0,1 a 5 mM) del agente reductor Trolox.

En cada pocillo se añadieron 300 µL de la mezcla de reacción (tampón acetato sódico 300 mM, pH 3,6; TPTZ 10 mM en HCl 40 mM; FeCl₃ x 6H₂O 20 mM, 10:1:1 V/V/V). Después, se añadieron 10 µL de H₂O (blanco), de las soluciones de Trolox o de concentraciones 5, 10 y 20 mg-equivalentes/L de Uin. La placa se incubó 15 min a temperatura ambiente y se midió la DO₅₉₃.

Estimación del daño oxidativo causado por Pph en plantas de alubia

Plantas de alubia desarrolladas en 18 recipientes de cultivo, con 14 días de crecimiento *in vitro* y las dos hojas cotiledonares bien formadas, se rociaron con 2 mL/hoja de agua o de Uin 20 mg-equivalentes/L.

Pasados 7 días, la mitad de las plantas control y de aquellas pretratadas con Uin se infectaron con Pph mediante pulverización sobre las hojas de un inóculo de la bacteria, mientras que el resto se pulverizaron con agua. Al cabo de 6 horas, se fotografiaron las plantas infectadas (control+ y Uin+) y no infectadas (control y Uin), así como hojas aisladas de éstas, y se realizó el ensayo DAB (3,3'-diaminobencidina). Para ello, cada hoja se colocó en un tubo Falcon y se incubó en una solución de DAB 1 mg/L (De la Rubia *et al.*, 2023) 4 h, en agitación y oscuridad. Tras la incubación, se retiró el DAB y se añadió el mismo volumen de una solución decolorante (etanol:ácido acético:glicerol, 3:1:1 V/V/V) que se hirvió durante 15 min. Las hojas se dejaron secar y se fotografiaron. El daño oxidativo se estimó como la intensidad del color marrón que presentaba cada hoja debido a la oxidación del DAB, para lo cual se utilizaron las fotografías y el *software* Photoshop. Finalmente, se aplicó un tratamiento estadístico en el que se realizó un ANOVA y el test post-hoc Tukey.

Resultados

Para conocer si la infusión de ortiga tenía actividad bactericida o bacteriostática que pudiera proteger a las plantas de alubia Riñón del patógeno *Pseudomonas syringae* (Pph), se realizaron bioensayos de crecimiento *in vitro* en medios con Uin. Los resultados se muestran en la **Figura 1**.

Se observó que el crecimiento de la bacteria en presencia de 1 mg-equivalente/mL de Uin fue mayor que en el control. Sin embargo, a medida que se incrementó la concentración de Uin de 4 a 20 mg-equivalentes/mL se redujo el crecimiento de la bacteria en un 30-40 %, no llegándose a alcanzar una concen-

tración que lo inhibiera en un 50 % (I_{50}) (**Figura 1**). En base a estos resultados, se decidió emplear la infusión de ortiga 20 mg-equivalentes/mL en los siguientes experimentos.

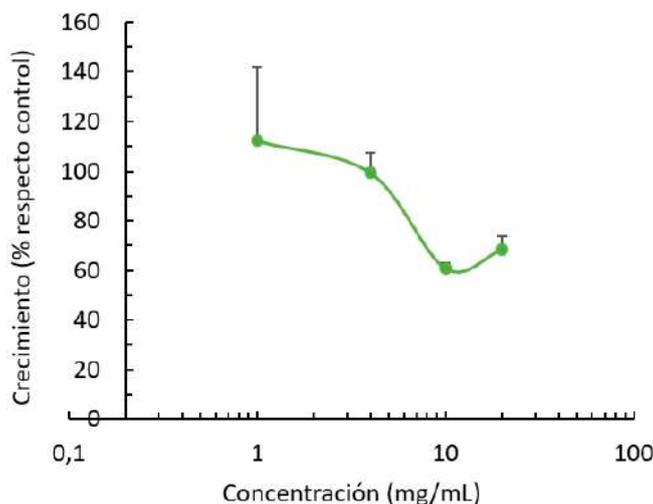


Figura 1. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) en presencia de diferentes concentraciones de infusión (Uin) respecto al control al cabo de 7 días. Los resultados muestran la media \pm DE (n=3).

Otra vía por la cual Uin podría proteger a las plantas es promoviendo o potenciando alguna de las respuestas de defensa que se activan en la alubia cuando es atacada por un patógeno, como por ejemplo la producción de ROS. Para comprobarlo, se estimó la liberación de H_2O_2 en discos foliares preincubados en Uin o en agua en respuesta a la flg22. Los resultados del ensayo aparecen en la **Figura 2**.

En los pocillos donde se encontraban los discos foliares preincubados en agua no se detectó emisión de luminiscencia al añadir agua a la mezcla de reacción (pre H_2O + H_2O , control), mientras que cuando se añadió flg22 sí se produjo una señal lumínica muy intensa (pre H_2O +flg22, control positivo) (**Figura 2**) tal como cabría esperar. En el caso de los discos preincubados en Uin, de nuevo no se registró luminiscencia en las dos horas siguientes tras añadir agua en los pocillos (preUin+ H_2O , control negativo), pero tampoco después de añadir flg22 (preUin+flg22) (**Figura 2**).

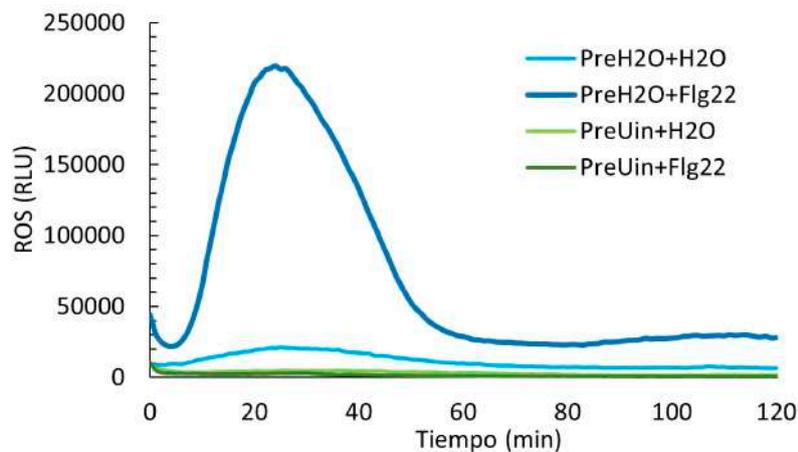


Figura 2. Cinéticas de producción de ROS en discos foliares de alubia preincubados en agua (preH₂O) o en Uin (preUin) en respuesta a flagelina (+flg22) o agua (+H₂O). Los ROS se estimaron como unidades de luminiscencia producidas por el luminol oxidado en presencia del H₂O₂ liberado por los discos y de la peroxidasa incorporada en la solución de reacción. Se representan las medias (n=7).

Una tercera vía de protección de la alubia Riñón sería que la infusión de ortiga tuviera compuestos que redujeran el daño oxidativo causado por la liberación de ROS que provoca Pph al infectar los tejidos. Para comprobarlo, se midió la capacidad antioxidante de Uin 20, 10 y 5 mg-equivalentes/mL por ensayo FRAP, obteniéndose valores de 1,88, 1,06 y 0,47 equivalentes-mM de Trolox, respectivamente.

Para determinar si la aplicación de Uin realmente protege del daño oxidativo que produce la infección, se realizó un experimento en plantas pretratadas o no con Uin 20 mg-equivalentes/mL 7 días antes de la infección. Una vez que ésta se llevó a cabo, el daño se estimó a las 6 horas mediante el análisis morfológico de las plantas (**Figura 3A**) y la tinción DAB de las hojas (**Figura 3C** y **Figura 4**). El DAB es un compuesto que, al ser oxidado por las peroxidasas de los tejidos en presencia del H₂O₂ resultante del estrés oxidativo, torna a un producto marrón oscuro que tiñe las zonas dañadas de las hojas.

Las plantas de alubia de 21 días que se pretrataron con Uin o con agua presentaron diferencias morfológicas, de modo que las primeras (Uin) mostraron en general un aspecto más vigoroso que las segundas (control) (**Figuras 3A y B, izq.**). Tras 6 h después de realizar la infección con Pph, todas las plantas presentaron amarilleamiento y epinastia foliar. También se pudieron observar en las hojas manchas necróticas correspondientes a puntos de infección (**Figuras 3A y B, der.**). Sin embargo, estos síntomas fueron bastante más aparentes en plantas control (control+) que en aquellas pretratadas con Uin (Uin+).

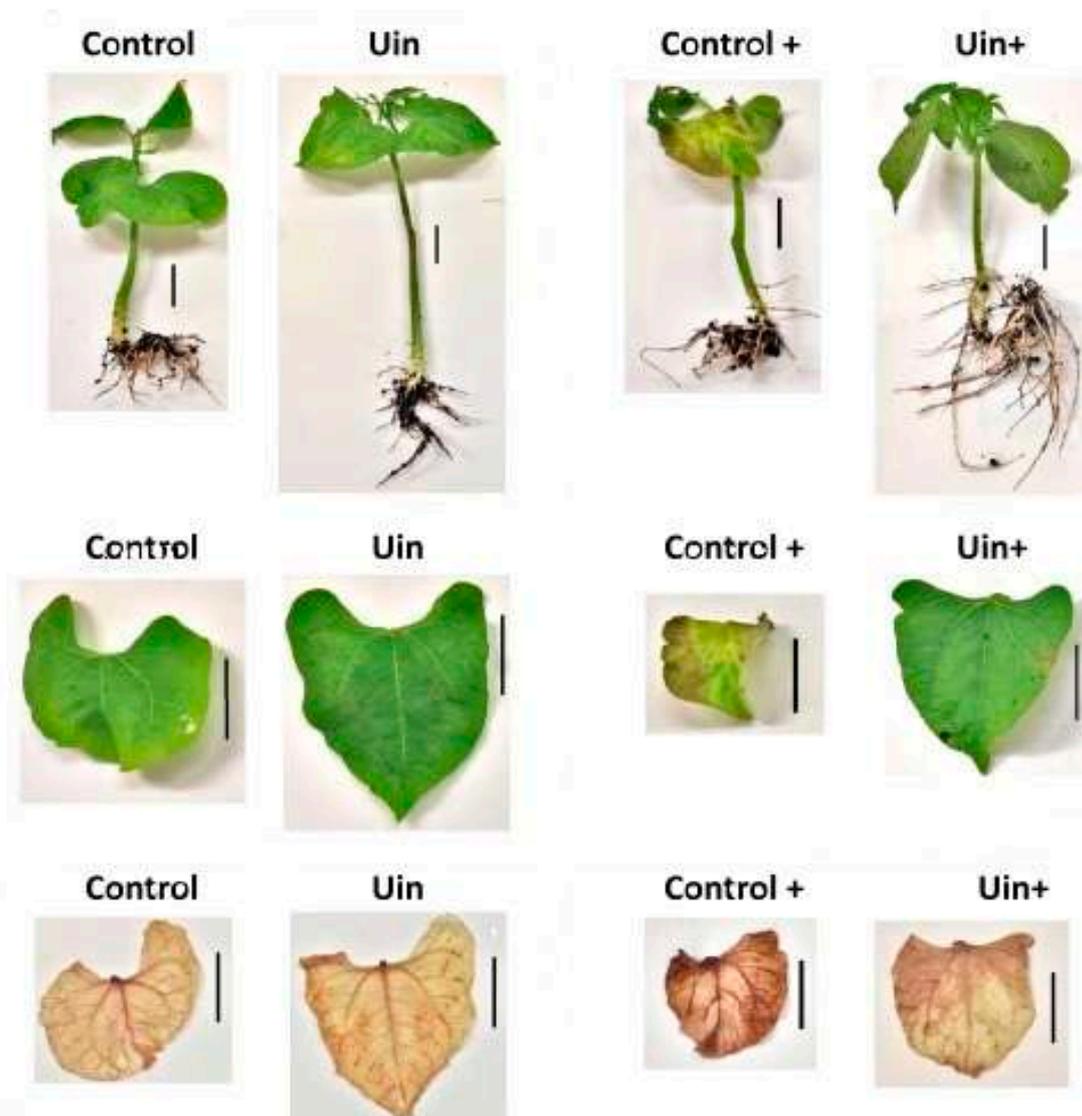


Figura 3. Aspecto de las plantas de alubia con 21 días de crecimiento (A) y de sus hojas aisladas (B). Las plantas se rociaron con agua o con Uin a los 14 días y, tras otros 7 días se infectaron con Pph (Control+ y Uin+) o no (Control, Uin). Las fotografías se tomaron 6 h después de la pulverización con Pph o con agua. (C) Aspecto de las mismas hojas teñidas con DAB. La intensidad/tonalidad oscura del marrón refleja el daño oxidativo. La barra negra indica una escala de 2 cm.

Cuando se estimó el daño oxidativo causado por Pph mediante tinción con DAB, se observó que la tonalidad oscura del color marrón fue más intensa y de distribución más amplia en las hojas de plantas control (control+) que en las aisladas de plantas pretratadas con Uin (Uin+). Las hojas de plantas no infectadas (control y Uin) apenas se tiñeron (**Figura 3C**) tal como cabría esperar, ya que no se vieron sometidas al agente de estrés.

Estas observaciones se corroboraron con los datos obtenidos al cuantificar la intensidad media del color marrón en las hojas por análisis de imágenes, que fue significativamente mayor en las control+ que en las Uin+ (**Figura 4**).

Los valores estimados en hojas de plantas no infectadas fueron los más bajos, con independencia de que antes hubieran sido rociadas o no con la infusión. Esto implica que las plantas tratadas con Uin sufrieron daño oxidativo por la infección con Pph pero en menor medida que las no tratadas, por lo que la infusión de ortiga sí parece que tuvo cierto efecto protector.

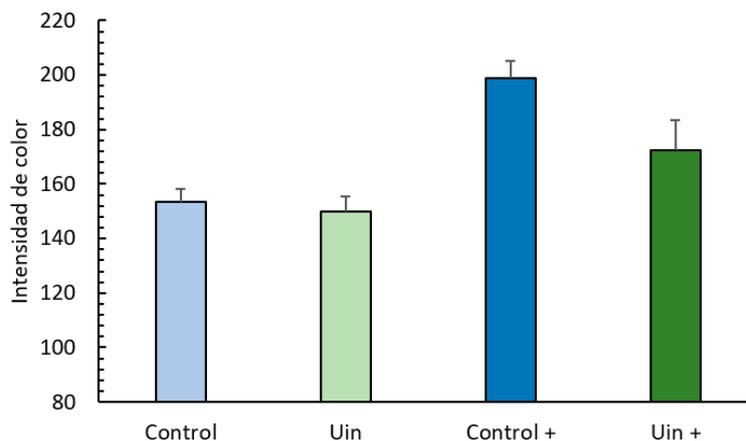


Figura 4. Intensidad del color marrón debido a la tinción con DAB de hojas de plantas de alubia pretratadas con agua o con Uin e infectadas con Pph (Control+, Uin+) o no (Control, Uin). La intensidad del color se estimó a partir de las fotografías de las hojas (**Figura 3C**) utilizando el programa Photoshop. Se representan media \pm DE (n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas entre medias de acuerdo con el test ANOVA y el post-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

Discusión

La ortiga es una planta herbácea considerada tradicionalmente como una mala hierba por los agricultores. Sin embargo, éstos también han utilizado y utilizan los extractos de ortiga macerados o fermentados para estimular el crecimiento de sus cultivos y repeler los insectos vectores de patógenos. De hecho, en el mercado actual existen diferentes PBP basados en ortiga y empleados como biosoluciones que promueven el crecimiento de las plantas. La actividad de un PBP depende de su composición química (Maricic *et al.*, 2021) y ésta, a su vez, de factores relativos al material utilizado para elaborarlo (órgano, genotipo y estado fisiológico de la planta de ortiga, etc.) y al procedimiento al que se somete (maceración, extracción con agua, con solventes, infusión, etc.) (Shonte *et al.*, 2020). Aun así, poco se conoce sobre el fundamento de los efectos positivos que tienen los preparados de ortiga sobre los cultivos.

De la Rubia *et al.* (2022) encontraron que las suspensiones de ortiga (Us) proporcionaban protección a plantas de alubia Riñón frente a la infección por Pph, el patógeno causante de la enfermedad de la grasa en variedades susceptibles, y que dicho efecto podría deberse a la actividad antimicrobiana del PBP. Los autores observaron que 1 mg/mL de Us reducía el crecimiento *in vitro* de la bacteria al 50 %. Desde un punto de vista práctico, las infusiones de ortiga (Uin) son mejor candidato a PBP que las Us pues al no presentar partículas en suspensión

facilitaría la aplicación en campo. Ahora bien, se espera que la composición de Uin varíe respecto a la de Us como consecuencia del proceso de infusión, que provoca, entre otros, desestabilización de las membranas celulares, degradación de compuestos termolábiles, desnaturalización de proteínas y liberación de oligosacáridos de las paredes celulares. Tales cambios podrían mejorar las propiedades antimicrobianas de Uin en relación a las de Us, pero los resultados del presente trabajo indican que no fue así (**Figura 1**).

Otra posible explicación del efecto protector que tuvo Us, y tal vez pueda tener Uin, en plantas de alubia Riñón frente a Pph sería que los preparados promovieran/potenciaran respuestas de defensa naturales en las plantas, incluso antes de que se produzca la infección, proceso conocido como “immune priming”. En apoyo a esta idea, De la Rubia *et al.* (2021) demostraron que la preincubación de discos foliares de alubia con INA activaba la producción de H_2O_2 en los tejidos en respuesta a flg22, proteína que se utiliza para mimetizar la infección por Pph en el ensayo del luminol. Además, la liberación de ROS se correspondió con la respuesta temprana característica de la inmunidad desencadenada por patrones o PTI pues el pico de luminiscencia, resultante de la oxidación del luminol por el H_2O_2 liberado, se observó en la primera hora de incubación con flg22 (Petrov *et al.*, 2015).

Cuando en el presente trabajo se repitió el ensayo con discos foliares pretratados con 20 mg-equivalentes de Uin, para comprobar si la infusión de ortiga tenía el mismo efecto que el INA, se obtuvo un resultado negativo, dado que no se detectó luminiscencia en respuesta a flagelina. Sin embargo, los discos preincubados en agua sí generaron un pico señal en el ensayo. Esto podría implicar que los discos pretratados con Uin también liberaron H_2O_2 pero que su actividad fue neutralizada por compuestos antioxidantes presentes en la infusión, impidiendo así la oxidación del luminol y la emisión de señal. En apoyo a esta idea, se probó que Uin 20 mg-equivalentes/mL tenía una capacidad antioxidante equivalente a la de una solución de Trolox 1,88 mM.

Para conocer si las propiedades antioxidantes de Uin podían realmente proporcionar cierta protección a la alubia Riñón frente a Pph, se hizo un experimento con plantas de 14 días que se rociaron o no con la infusión y 7 días después se infectaron con la bacteria. Lo primero que se observó fue que el aspecto de las plantas de 21 días pretratadas con Uin fue más vigoroso que el de las plantas control. El efecto bioestimulante de los preparados de ortiga se ha descrito previamente en plantas de alubia (Maricic *et al.*, 2022) y puede deberse al contenido en aminoácidos esenciales, vitaminas, isolectinas y elementos minerales como el hierro (Maricic *et al.*, 2021), útiles para el crecimiento de las plantas.

Una vez infectadas las plantas con Pph, éstas presentaron a las 6 horas los siguientes síntomas de la enfermedad. En primer lugar, la presencia de puntos de necrosis y el amarilleamiento zonal en las hojas. En segundo, la epinastia foliar, que consiste en la curvatura hacia abajo de las hojas resultante de un cre-

cimiento más rápido en las células de la cara superior del peciolo que en las de la cara inferior (Taiz *et al.*, 2015). La epinastia es un proceso promovido por etileno, fitohormona gaseosa que regula en general las respuestas de las plantas al estrés (Iqbal *et al.*, 2017). Así pues, cabe pensar que las plantas de alubia sintetizaron etileno en respuesta al estrés causado por la infección y que su acumulación en los recipientes cerrados provocó la epinastia de las hojas. El tercer síntoma observado en las plantas infectadas con Pph fue el daño oxidativo, estimado en las hojas mediante tinción con DAB. En este sentido, De la Rubia *et al.* (2023) también detectaron daño oxidativo causado por Pph en plantas de alubia Riñón ya a las 2 h de la infección.

A pesar de que los síntomas descritos se observaron en todas las plantas, los dos primeros tuvieron menor presencia en plantas pretratadas con Uin que en plantas control, y el tercero fue significativamente menor en plantas pretratadas. Por lo tanto, los resultados apuntan a que, efectivamente, las propiedades protectoras de la infusión estarían relacionadas con la presencia de compuestos bioactivos con actividad antioxidante, como pueden ser algunos ácidos fenólicos (Cabrera-Soto *et al.*, 2009) y flavonoides (Hidalgo *et al.*, 2010) detectados con anterioridad en hojas de ortiga (revisión en Grauso *et al.*, 2020). Ahora bien, los flavonoides son moléculas termolábiles por encima de 75 °C (Zhang *et al.*, 2019), por lo que muy probablemente se degradan durante el proceso de infusión por autoclavado a 121 °C aplicado para obtener Uin. Sin embargo, los ácidos fenólicos son capaces de soportar altas temperaturas, de hasta 150 °C (Lou *et al.*, 2014), por lo que serían mejores candidatos para justificar las propiedades fitoprotectoras de Uin.

Así pues, de los resultados de este trabajo se puede concluir que el tratamiento de plantas de alubia Riñón con infusiones de ortiga aumenta el vigor y reduce el estrés oxidativo causado por la infección con Pph. Las propiedades antioxidantes del PBP se deben, probablemente, a la presencia de ácidos fenólicos. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis habría que aislar la fracción fenólica de la infusión y repetir los ensayos de infección de alubia con Pph y otros fitopatógenos. Del mismo modo, para probar el efecto bioestimulante de Uin sería necesario hacer de nuevo los ensayos de aplicación y estimar en las plantas algunos parámetros de crecimiento, fotosintéticos y bioquímicos.

Referencias

- Benzie, I.F.F. y Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70–76.
- Cabrera-Soto, M.L., Salinas-Moreno, Y., Velázquez-Cardelas, G.A. y Espinosa Trujillo, E. 2009. Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas. *Agrociencia*, 43(8): 827–839.

- Couto, D. y Zipfel, C. 2016. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Natural Reviews Immunology*, 16, 537–552.
- De la Rubia, A.G., De Castro, M., Medina-Lozano, I. y García-Angulo, P. 2022. Using plant-based preparations to protect common bean against halo blight disease: The potential of nettle to trigger the immune system. *Agronomy*, 12(1): 63.
- De la Rubia, A.G., Largo-Gosens, A., Yusta, R., Sepúlveda-Orellana, P., *et al.* 2023. A novel pectin methylesterase inhibitor, PMEI3, in common bean suggests a key role of pectin methylesterification in *Pseudomonas* resistance. *Journal of Experimental Botany*, *erad* 362. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad362>
- De la Rubia, A.G., Mérida, H., Centeno, M.L., Encina, A. y García-Angulo, P. 2021. Immune priming triggers cell wall remodeling and increased resistance to halo blight disease in common bean. *Plants*, 10(8): 1514.
- Grauso, L., Falco, B. y Motti, R. 2020. Stinging nettle, *Urtica dioica* L.: botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 19: 1341–1377.
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C. y de Pascual-Teresa, S. 2010. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(3): 691–696.
- Iqbal, N., Khan, N.A., Ferrante, A., Trivellini, A., *et al.* 2017. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 8: 475.
- Lou, S.N., Lin, Y.S., Hsu, Y.S., Chiu, E.M. y Ho, C.T. 2014. Soluble and insoluble phenolic compounds and antioxidant activity of immature calamondin affected by solvents and heat treatment. *Food Chemistry*, 161: 246–253.
- Maričić, B., Brkljača, M., Ban, D., Palčić, I., Franin, K., Marčelić, S. y Goreta Ban, S. 2022. Non-aerated common nettle (*Urtica dioica* L.) extract enhances green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and soil enzyme activity. *Life*, 12(12), 2145.
- Maričić, B., Radman, S., Romić, M., Perković, J., *et al.* 2021. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as an aqueous plant-based extract fertilizer in green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sustainable agriculture. *Sustainability*, 13(7): 4042.
- Ministerio de Derechos Sociales y Agenda 2030. 2018. *Plan de Acción para la Implementación de la Agenda 2030*. Disponible en: <https://www.mdsocialesa2030.gob.es/agenda2030/documentos/plan-accion-implementacion-a2030.pdf> (Accedido: 20 de junio de 2023).
- Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B. y Gechev, T.S. 2015. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6: 69.
- Shonte, T.T., Duodu K.G. y de Kock, H.L. 2020. Effect of drying methods on chemical composition and antioxidant activity of underutilized stinging nettle leaves. *Helvion*, 6(5): e03938.

- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M. y Murphy, A. 2015. *Plant Physiology*. 6^a ed. Sunderland: Sinauer.
- Tarkowski Ł.P., Van de Poel B., Höfte M. y Van den Ende, W. 2019. Sweet immunity: inulin boosts resistance of lettuce (*Lactuca sativa*) against grey mold (*Botrytis cinerea*) in an ethylene-dependent manner. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5): 1052.
- Van Lenteren, J.C. 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, 57: 1–20.
- Verma, S., Nizam, S. y Verma, P.K. 2013. Biotic and Abiotic Stress Signaling in Plants en Sarwat, M., Ahmad, A. y Abdin, M. (eds.). En *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective*, 1.^a ed. New York: Springer, pp. 25–49.
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y. *et al.* 2018. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 124: 198–202.
- Zhang, X., Wang, X., Wang, M., Cao, J. *et al.* 2019. Effects of different pretreatments on flavonoids and antioxidant activity of *Dryopteris erythrosora* leave. *PLoS One*, 14(1): e0200174.
- Zipfel, C. y Oldroyd, G. 2017. Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 543: 328–336.