



Grado en Biología

Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla

Estudio del efecto de diferentes biofungicidas en plantas de maíz para el control de hongos micotoxigénicos

Autora: Paula Martín Velázquez

Tutoras:

Ana Aguado Puig. Dpto. Biotecnología Vegetal. IFAPA “Las Torres”.

M^a Rosario Álvarez Morales. Dpto. de Biología Vegetal y Ecología. Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

Fecha: Septiembre, 2022

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
1. El maíz	5
2. Mecanismos de defensa vegetal	5
3. Infección causada por <i>Fusarium verticillioides</i>	5
4. Estrategias de diferentes biocontroles para combatir la infección por hongo	7
4.1. El uso de algas para inhibir la propagación de los hongos	
4.2. Las bacterias como medida de control biológico	
4.3. El uso de plantas biocidas para reducir la infección por hongos	
OBJETIVOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
1. Material fúngico	9
2. Actividad fungistática <i>in vitro</i>	9
2.1. Actividad fungistática de las algas	
2.2. Actividad fungistática de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
2.3. Actividad fungistática de las plantas biocidas	
3. Ensayo en plantas de maíz	13
3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	
3.2. Aplicación de los extractos de microalgas	
3.3. Inoculación de las plantas con la <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
3.4. Inoculación de las plantas con <i>Fusarium verticillioides</i>	
3.5. Tratamientos de las plantas con algas, hongo y bacteria	

3.6. Determinación de las actividades enzimáticas en hojas de maíz	
3.6.1. Medida de la actividad enzimática de la β -1,3-glucanasa	
3.6.2. Medida de la actividad enzimática de la quitinasa	
3.7. Determinación de proteínas solubles	
4. Análisis estadístico	16

RESULTADOS

1. Actividad fungistática de las algas en placa	16
2. Actividad fungistática de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> en placa	17
3. Actividad fungistática de las plantas biocidas en placa	18
4. Ensayo con plantas de maíz	19
4.1. Efecto de los tratamientos sobre el incremento de altura	
4.2. Efecto de los tratamientos sobre el peso aéreo	
4.3. Efecto de los tratamientos sobre el peso radicular	
4.4. Efecto de los tratamientos sobre la actividad β -1,3-glucanasa	
4.5. Efecto de los tratamientos sobre la actividad quitinasa	

DISCUSIÓN

1. Actividad fungistática de las algas <i>in vitro</i>	26
2. Actividad fungistática de <i>Bacillus amyloliquefaciens in vitro</i>	26
3. Actividad fungistática de las plantas biocidas <i>in vitro</i>	27
4. Efecto de los diferentes tratamientos sobre las plantas de maíz	27
4.1. Efecto sobre el crecimiento vegetal	
4.4. Efecto sobre la actividad β -1,3-glucanasa y quitinasa	

CONCLUSIONES	30
---------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	30
---------------------------	----

RESUMEN

Los hongos micotoxigénicos suponen una amenaza para el cultivo de numerosas especies vegetales como el maíz. Las infecciones por parte de estos microorganismos no solo van a afectar a la cantidad y calidad del producto obtenido, sino que van a generar una serie de micotoxinas como la fumonisina y las aflatoxinas que suponen un peligro tanto para el consumo humano como para el consumo animal. Hasta ahora, el control de estos hongos se ha realizado mediante el uso de fungicidas sintéticos. Su impacto negativo en el medio ambiente y en la salud de los consumidores, así como un decreciente apoyo de su uso por parte de los organismos legislativos, hace que encontrar alternativas a los mismos sea esencial.

En este trabajo se ha estudiado la efectividad de diferentes biofungicidas como posibles alternativas de control biológico para distintas especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. Se ha enfrentado *in vitro* a los patógenos con distintas combinaciones de plantas biocidas (destacando el género *Brassica*). Además, se ha estudiado la aplicación de extracto de microalga a distintas concentraciones, y la aplicación de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, con el fin de comprobar su capacidad de inhibición del crecimiento fúngico. Por otro lado, se han realizado ensayos en plantas de maíz bajo condiciones controladas, aplicando distintas concentraciones de extracto de microalga y un inóculo de la bacteria a plantas inoculadas y no inoculadas con *Fusarium verticillioides*, valorándose tanto caracteres fisiológicos que reflejen el desarrollo de la planta, como la presencia de enzimas implicadas en la respuesta de defensa vegetal.

La aplicación del extracto de microalgas no ha resultado efectiva en ningún caso, llegando a favorecer el crecimiento en placa de los distintos patógenos. Sin embargo, el uso de la bacteria ha revelado el potencial fungistático de este microorganismo, pues ha logrado inhibir el crecimiento de los cuatro hongos estudiados. En el caso de las plantas biocidas, también se observan unos altos porcentajes de inhibición, lo que muestra las propiedades antifúngicas de los compuestos volátiles generados por estos vegetales. El estudio en plantas de maíz ha mostrado cómo la aplicación foliar de extracto de algas mitiga uno de los principales síntomas observados en las plantas infectadas con *F. verticillioides*: la disminución de la altura de la planta. A pesar de esto, la bacteria sigue siendo más efectiva, pues su aplicación hace que las plantas superen significativamente en altura y peso (aéreo y radicular) a las plantas control.

INTRODUCCIÓN

1. El maíz

El maíz (*Zea mays L.*) es una gramínea que se introdujo en España en el siglo XVI desde América central y, actualmente, se trata de una de las herbáceas más cultivadas en el mundo, siendo Estados Unidos el mayor productor a nivel global. Se trata de una planta de climas templados, sensible al frío, y que requiere de una temperatura óptima de germinación y crecimiento de entre 21°C y 30°C. Su importancia reside en sus diversas aplicaciones, siendo una planta muy utilizada en los ámbitos alimenticio e industrial principalmente. A nivel nacional, las principales comunidades productoras de maíz son Castilla y León, Extremadura y Aragón. En Andalucía, donde se produce entre el 5% y el 10% del total de la producción nacional, Sevilla produce entre 100.000 y 200.000 toneladas anuales, superando a las demás provincias de la comunidad autónoma [1].

2. Infección causada por *Fusarium verticillioides*

Los cultivos y la producción de este cereal se ven mermadas por *Fusarium verticillioides*, un ascomiceto patógeno que infecta al maíz. Este produce una serie de enzimas líticas y toxinas que contribuyen al proceso de infección, llegando a afectar a raíces, tallos y mazorcas [2]. La mayoría de las cepas de este hongo producen fumonisinas, micotoxinas solubles de entre las cuales destaca la fumonisina B1 (FB1), que causa el 70% de las contaminaciones que se dan en el maíz de forma natural [3].

El hongo tiene la capacidad de utilizar múltiples vías de entrada a la planta para la colonización de distintos tejidos. Este puede penetrar en los tejidos de semillas o plántulas, pudiendo llegar a pudrir algunas de sus estructuras. También puede infectarse la mazorca por medio del estigma, o bien se puede dar la infección debido a daño mecánico, el cual normalmente es provocado por plagas del maíz, que van a lesionar las mazorcas y tallos de las plantas. Algunos de estos insectos funcionan como vectores para el hongo, ya que permiten la supervivencia del mismo en sus órganos externos y transportan al patógeno a lo largo de una misma planta o a plantas distintas. Estas rutas no son excluyentes; las plantas en el campo pueden ser infectadas por una o más vías y por distintas cepas del hongo [2].

El control de las infecciones por *Fusarium verticillioides* es fundamental, ya que la presencia de fumonisina va a tener efectos muy negativos en el consumo por parte de

personas y animales, pudiendo llevar al desarrollo de patologías graves como tumores renales o cáncer de esófago en personas, y lesiones pulmonares en cerdos o leucoencefalopatías en equinos [4].

A nivel de la planta, uno de los principales blancos moleculares de la FB1 es la actividad ceramida sintasa, que participa en la biosíntesis de esfingolípidos. La micotoxina posee una estructura muy similar químicamente a la de una esfingosina, por lo que ambas moléculas van a competir por unirse al sitio activo de la ceramida sintasa. Esta inhibición enzimática va a resultar en una serie de desajustes celulares como pueden ser la producción y acumulación de metabolitos perjudiciales, pudiendo llegar a provocar la muerte celular [5].

Por otro lado, un estudio realizado *in vitro* ha confirmado que también afecta a la ATPasa de H⁺, una enzima presente en la membrana plasmática que transporta protones del citosol al espacio apoplástico tomando la energía de la hidrólisis de ATP. Esta mantiene un potencial de membrana negativo y un gradiente transmembranal de pH, además de participar en la respuesta de defensa de la planta. La inhibición de dicha proteína acorta la elongación de la raíz y el tallo, además de provocar una reducción importante en la acidificación del medio [2, 6].

Otra diana celular de la FB1 es la β -1,3-glucanasa, enzima hidrolítica que se sintetiza como respuesta de defensa junto con la quitinasa, especialmente ante el ataque de hongos filamentosos, con el fin de degradar la pared celular del patógeno. Se ha demostrado que la FB1 regula la actividad de distintas isoformas de esta enzima, inhibiendo las formas básicas e induciendo la actividad de la forma ácida. Estos resultados muestran la importancia de la β -1,3-glucanasa como diana de esta micotoxina, la cual es capaz de modular su actividad enzimática, lo que puede jugar un papel importante en la colonización por parte de *F. verticillioides* [2, 7, 8].

3. Mecanismos de defensa vegetal

Cuando un hongo infecta a una planta, se van a suceder una serie de eventos, como la adhesión del patógeno a la planta, la degradación de los componentes de la pared celular, o la producción de toxinas. Ante esa situación, la planta tendrá una primera respuesta, la cual consiste en la necrotización de los tejidos próximos a la zona de penetración del hongo, lo que pretende impedir que el hongo se multiplique y se propague

por el resto de los órganos vegetales. Posteriormente, se da una reacción sistémica en la que intervienen todos los tejidos de la planta, no solo el afectado de forma directa [9, 10].

Existen muchas proteínas implicadas en la respuesta de defensa de las plantas. Dentro de las proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) se incluyen las β -1,3- glucanasas, enzimas que hidrolizan los glucanos que conforman la pared celular de los hongos. Estas, al actuar de forma sinérgica junto con las enzimas quitinasas, las cuales tienen actividad hidrolítica, van a potenciar su efecto, aumentando el daño producido en las paredes del patógeno [10].

4. Estrategias de diferentes biofungicidas para combatir la infección por hongo

4.1. El uso de algas para inhibir la propagación de los hongos

En cuanto al control de estos organismos se han desarrollado distintas prácticas culturales, de control biológico y de control químico, siendo este último más económico y eficaz que los anteriores. Los fungicidas sistémicos como los benzimidazoles pueden actuar como agentes mutagénicos de la planta, y su uso repetido puede resultar en el desarrollo de resistencia por parte del patógeno, además de tener efectos adversos sobre el medioambiente y sobre las personas expuestas a los mismos. Es por esto que el desarrollo de nuevas técnicas que permitan reducir al máximo el uso de estos plaguicidas sintéticos es tan importante [11].

El uso de organismos como las algas para el control de estos patógenos cada vez es más popular, pues producen una serie de moléculas bioactivas que no solo son antibióticas, sino que también presentan actividad antiviral o antitumoral entre otras, por lo que sus aplicaciones cada vez serán más extensas. Se ha demostrado que las macroalgas son un excelente agente biológico para el control de la fusariosis, siendo una alternativa sostenible a los fungicidas químicos, y proporcionando una fuente de nutrientes a la planta que mejora su producción [12]. En cuanto a las microalgas, se han realizado estudios *in vitro* que demuestran su capacidad de reprimir el crecimiento de distintos hongos [13]. El uso de extractos fenólicos y carotenoides extraídos de microalgas como *Nannochloropsis* para el control de distintas especies de *Fusarium* ha abierto una vía muy interesante de investigación, pues se han obtenido resultados muy prometedores incluso a bajas concentraciones de dichos compuestos [13-15].

4.2. Las bacterias como medida de control biológico

Mediante la búsqueda de antagonistas naturales de estos hongos, se ha comprobado la eficacia del uso de bacterias en el control de hongos patógenos. Estas actúan a través de diversos mecanismos, como la síntesis de metabolitos antifúngicos o la secreción de enzimas hidrolíticas, que van a alterar la estructura del micelio y a debilitar la pared celular. Un ejemplo serían las bacterias del género *Bacillus*, dentro del cual encontramos distintas especies que protegen a la planta de diversos patógenos presentes en la rizosfera, además de promover el crecimiento vegetal [16]. Estudios realizados con distintas cepas del género han demostrado que estas bacterias son capaces de inhibir de forma significativa el crecimiento de *F. verticillioides* en maíz y, en algunos casos, llegan a reducir la producción de fumonisina *in vitro* hasta en un 50% [17]. *Bacillus* es un género muy extenso, constituido por una amplia variedad de cepas con propiedades muy interesantes desde el punto de vista agronómico. Por ejemplo, se han identificado bacterias capaces de promover el crecimiento del maíz en condiciones de estrés salino [18], o que poseen actividad insecticida frente a plagas como el gusano cogollero del maíz [19].

4.3. El uso de plantas biocidas para reducir la infección por hongos

Actualmente se conocen diversos compuestos derivados de plantas (aceites esenciales, metabolitos secundarios) que también son eficaces frente a las infecciones de diversas especies de microorganismos patógenos [20]. Las plantas del orden *Brassicales* son un buen ejemplo, pues poseen un mecanismo químico de defensa basado en un grupo de metabolitos llamado glucosinolatos. Cuando estos compuestos son hidrolizados por una enzima llamada mirosinasa, también presente en estas plantas, se generan una serie de productos activos biológicamente, como los isotiocianatos, nitrilos o tiocianatos, que son los que realmente ejercen la función de defensa. Estos compuestos defienden de forma inducible y constitutiva a la planta frente al ataque de patógeno e insectos herbívoros [21]. El uso de herbáceas como la mostaza ha resultado ser un buen método para reducir el efecto de la infección por distintas especies de *Fusarium* en plantas de maíz, llegando las plantas infectadas a igualar o incluso superar a las plantas control en crecimiento. Además, la presencia de esta brasicácea también reduce de forma notable la cantidad de biomasa fúngica en los suelos infectados [22]. El uso de estas plantas también ayuda a controlar a las poblaciones de nematodos perjudiciales y van a contribuir al buen mantenimiento del suelo [23].

OBJETIVOS

1. Estudiar el efecto de distintas dosis de un extracto de microalga sobre el crecimiento *in vitro* de varios hongos micotoxigénicos de los géneros *Aspergillus* (*A. flavus* y *A. parasiticus*) y *Fusarium* (*F. proliferatum* y *F. verticillioides*).
2. Analizar el efecto de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre el crecimiento *in vitro* de hongos micotoxigénicos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*.
3. Estudiar el efecto fungicida y/o fungistático de los compuestos volátiles producidos por 5 tratamientos distintos constituidos por plantas del género *Brassica* sobre el desarrollo de los hongos micotoxigénicos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*.
4. Estudiar el efecto de la inoculación de *F. verticillioides* en la zona de la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en condiciones controladas, así como la efectividad de la aplicación foliar de extracto de microalga a distintas concentraciones (1% y 0,5%) a la hora de mitigar los efectos de la infección.
5. Estudiar el efecto de la aplicación de *B. amyloliquefaciens* en la zona de la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en condiciones controladas e infectadas por el patógeno *F. verticillioides*.
6. Determinar la actividad de las enzimas β -1,3-glucanasa y quitinasa en hojas de plantas de maíz tratadas con el extracto de microalga o la inoculación de la bacteria como respuesta de defensa tras la infección por *F. verticillioides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material fúngico

Para la obtención de los hongos, se cultivaron en placas de Petri en medio PDA (Potato Dextrose Agar) los siguientes hongos: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *A. flavus* o *A. parasiticus* en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Las placas replicadas se colocaron en una estufa a 27°C para favorecer el crecimiento del hongo.

2. Actividad fungistática *in vitro*

2.1 Actividad fungistática de la microalga

El extracto de microalga, cuya identificación se encuentra en proceso de estudio, fue proporcionado por la Universidad de Almería, por el grupo de Gabriel Acién. Se realizaron alícuotas en tubos Eppendorf de plástico de 1.5 mL y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Para demostrar el efecto fungistático o fungicida de la microalga, se realizó un ensayo en placas de Petri con medio PDA. Se tomó un botón del hongo y se colocó en

el centro de la placa. En cuatro puntos de la misma placa se aplicaron 100 µl de extracto de alga a distintas concentraciones (1%, 0.5%, 0.1% y 0.05). Los hongos patógenos valorados fueron *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Se sembraron 5 placas por cada hongo (4 repeticiones con los extractos, y una placa control que solo tenía el botón, para poder comparar el crecimiento del hongo con y sin alga). De manera casual, en una de las placas se observó la presencia de una contaminación bacteriana que frenó el crecimiento de *F. proliferatum* (Fig. 1).

Para medir el diámetro o área del crecimiento fúngico se utilizó el programa *ImageJ*.

El porcentaje de inhibición se calculó como $\frac{\text{Diámetro control} - \text{Diámetro placa}}{\text{Diámetro control}} \times 100$ en el caso de *Fusarium*, y como $\frac{\text{Área control} - \text{Área placa}}{\text{Área control}} \times 100$ en el caso de *Aspergillus*.

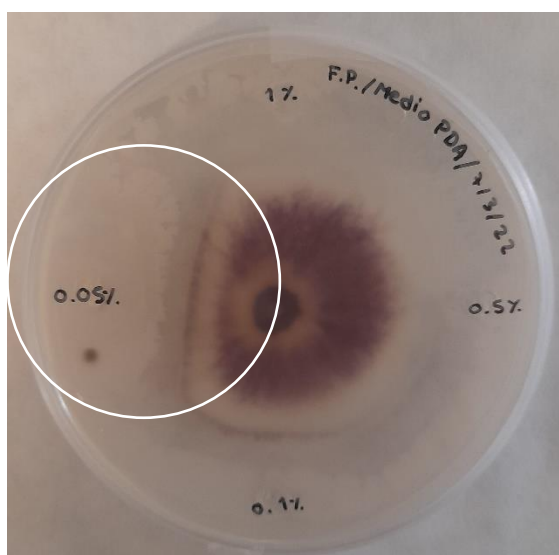


Figura 1. Placa de Petri con medio PDA en la que se estudió el crecimiento de *F. proliferatum* en presencia de extracto de microalga a distintas concentraciones. Se observó la presencia de una contaminación bacteriana que frenó de forma notable el desarrollo del hongo; la zona de inhibición se encuentra señalada en la imagen.

2.2. Actividad fungistática de la *Bacillus amyloliquefaciens*

- **Aislamiento de la bacteria**

La bacteria se aisló como una contaminación en una placa de crecimiento de *F. proliferatum* (Fig. 1). Se preparó 1 litro de medio TSB (*Tryptic Soy Broth*) (30g/l) con Bacto Agar (20g/l) y agua destilada, se vertió en placas de Petri y se sembró la bacteria con el uso de un asa estéril en campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

- **Identificación molecular de la bacteria**

Para extraer el ADN bacteriano se preparó un tampón de lisis con SDS al 0.25% y NaOH a 0.05M, añadiendo agua estéril hasta completar 1000 ml.

Para la obtención del ADN, se raspó un poco de biomasa de una placa, y se mezcló con 20 µl de tampón de lisis en un Eppendorf. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 90°C y 800 rpm. Después se añadieron 100µl de agua estéril, y se centrifugó 10 minutos a 1300 rpm. Con el sobrenadante se prepararon las distintas diluciones para realizar una PCR posteriormente. Se prepararon 5 muestras, 3 de ellas diluidas (1:10, 1:100 y 1:1000), un control negativo y una muestra con ADN sin diluir (100%).

El ADNr 16S se amplificó utilizando los cebadores 8F y 1522R. Cada mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía tampón de PCR, 4 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 0,6 µM de cada cebador, y 0,5 µL de ADN polimerasa de alta fidelidad Taq i-*Pfu* (2,5 U/µL). Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 20 segundos, 55°C durante 20 segundos y 72°C durante 1 minuto, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, y el tamaño esperado del amplicón era de 1495 pares de bases. Se obtuvieron los resultados esperados con la muestra de ADN sin diluir, por lo que esta se envió a secuenciar.

- **Actividad fungistática de la bacteria en placa**

Se hizo crecer a la bacteria en medio líquido. Se preparó medio TSB (30g/l) con agua destilada. Tras esterilizarlo, se hizo un raspado de una placa de Petri con césped de la bacteria y se añadió al medio. La bacteria se dejó crecer en agitación a 1500 rpm a 25°C durante 24 horas. Se centrifugó el medio durante 5 minutos, se tiró el sobrenadante y el pellet se diluyó en tampón sulfato de magnesio 0.03M previamente autoclavado.

Para demostrar el efecto fungistático de la bacteria se utilizaron placas de Petri con medio TSB sólido. Un botón del hongo se colocó en el centro de la placa. En cuatro puntos de la misma placa se aplicaron 5 µl de la bacteria diluida en tampón sulfato. Este proceso se realizó con los cuatro hongos mencionados, y se hicieron 5 placas por hongo: 4 repeticiones con la bacteria y el hongo y una control que solo contenía el hongo.

Para medir el diámetro o área del crecimiento fúngico se utilizó el programa *ImageJ*. Se utilizaron las mismas fórmulas que en el apartado 2.1. de materiales y métodos para calcular los porcentajes de inhibición en los distintos casos.

2.3. Actividad fungistática de las plantas biocidas

Se estudió la actividad fungistática de distintos tratamientos compuestos por plantas herbáceas pertenecientes al género *Brassica*. Se diseñaron un total de 5 tratamientos distintos, cada uno de ellos con una combinación distinta de las plantas de interés:

Tratamiento	Composición
BIOFUM	· Rábano multirresistente · Rúcula multirresistente
FUNGIREDEX	· Rábano · <i>Phacelia</i> · Trébol alejandrino
NEMAREDEX	· Rábano multirresistente · <i>Phacelia</i> · Rúcula
NITRAFIX	· Colza · Nabo
VITARO	· Mostaza blanca

Tabla 1. Composición de los distintos tratamientos de plantas del orden *Brassica* utilizados para estudiar su actividad antifúngica sobre el desarrollo de distintos hongos micotoxigénicos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*.

Se estudió la actividad antifúngica de los distintos tratamientos con los 4 hongos, realizando 3 repeticiones por hongo, además de realizar 4 controles por hongo con el fin de comparar el crecimiento de este con el de los hongos tratados.

Se prepararon 22 placas de Petri con medio PDA por cada hongo. 18 de estas placas fueron enfrentadas a los distintos tratamientos mientras que las 4 restantes se utilizaron como controles.

Los tratamientos de plantas biocidas se trituraron, y se prepararon 16 vasos de precipitado por cada tratamiento (Tabla 1). En cada uno de estos vasos se añadieron 50 g del material vegetal del tratamiento correspondiente. Previamente las plantas fueron desinfectadas con lejía al 20% y enjuagadas en agua destilada. A medida que los vasos se preparaban, se colocaban las placas correspondientes boca abajo encima del vaso, y con ayuda de parafina y celo se selló el sistema para impedir la salida de los gases emitidos por los tratamientos. Cada placa se etiquetó con el nombre del hongo y del tratamiento utilizado. Estas se almacenaron en una cámara de cultivo, y se hicieron fotos periódicamente con el fin de observar el crecimiento del hongo. El ensayo se mantuvo activo durante 15 días.

Al desmontar el ensayo, se tomaron aquellas placas en las que no hubo crecimiento del hongo, y se pasó el botón a una placa de Petri con medio PDA nueva para ver si las plantas tenían efecto fungicida o fungistático.

3. Ensayo con plantas de maíz

3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L. var 68K). En primer lugar, se realizó una prueba de germinación en una placa de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada, donde se obtuvo una tasa de germinación del 100%. Se sembraron un total de 100 semillas en macetas con turba previamente desinfectadas con lejía, y se dispusieron al azar en bandejas. Las plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo con ciclos de 16 horas de luz a 25°C y de 8 horas de oscuridad a 18°C, con una humedad del 80%.

Se diseñaron un total de 7 tratamientos que se muestran en el punto 3.5 de materiales y métodos. En cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones con 4 plantas por repetición, es decir, 16 plantas por tratamiento. Las plantas se regaron con agua de grifo suministrada directamente a través de la bandeja, con más o menos frecuencia según la humedad de la turba. Durante el ensayo se realizaron tres aplicaciones de medio nutritivo [24].

3.2. Aplicación del extracto de microalga

Para preparar las distintas concentraciones del extracto, se realizaron dos diluciones en agua, una al 0.5% y otra al 1%. Se realizaron dos aplicaciones foliares, una un mes después de la siembra, pulverizando a las plantas que no llevaban alga con agua (control) y otra una semana después de la inoculación del hongo a modo de recuerdo.

3.3. Inoculación de las plantas con *Bacillus amyloliquefaciens*

Para la inoculación de las plantas con la bacteria, esta se hizo crecer en medio líquido y se diluyó en tampón sulfato de magnesio 0.03M siguiendo el proceso del punto 2.2 de materiales y métodos.

Se aplicaron 15 ml del inóculo en las plantas del tratamiento 7 en la zona de la rizosfera. Se realizó este proceso unas dos semanas después de la siembra, y se repitió la semana anterior y posterior a la inoculación con el patógeno.

3.4. Inoculación de las plantas con *Fusarium verticillioides*

En primer lugar, se autoclavó el medio de cultivo para hongos, Czapek. A continuación, se tomaron 16 botones de las placas con PDA sembradas con *F.*

verticillioides y se añadieron al medio. Se mantuvo el medio en agitación a 1500 rpm a 25°C durante 9 días.

Tras el período de crecimiento se diluyeron 200 ml del medio con el hongo en 1800 ml de agua destilada, y se aplicaron 50 ml en la zona de la rizosfera de las plantas (tratamientos 4, 5, 6 y 7).

Para los tratamientos sin hongo se tomaron 200 ml del medio sin hongo y se diluyó de la misma forma, con 1800 ml de agua destilada. Se aplicaron 50 ml por planta (tratamientos 1, 2 y 3).

La inoculación se realizó dos meses después de la siembra.

3.5. Tratamientos de las plantas con extracto de microalga, *Fusarium verticillioides* y *Bacillus amyloliquefaciens*

Para este trabajo, se realizaron los siguientes tratamientos:

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7
Extracto de microalga	No	1%	0,5%	No	1%	0,5%	No
Presencia de hongo	No	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Presencia de bacteria	No	No	No	No	No	No	Sí

Tabla 2. Tratamientos realizados en el ensayo. Se indica la dosis de extracto de microalga aplicada en presencia o ausencia del hongo (*Fusarium verticillioices*) y si las plantas han sido inoculadas con la bacteria.

Una vez finalizado el ensayo, que duró un total de 81 días, se separaron las hojas, raíces y tallos de cada planta. Se tomó una hoja en buen estado, la raíz, y tres zonas del tallo (bajo, medio y alto) que se congelaron hasta su utilización.

Todos estos ensayos se realizaron en el IFAPA las Torres (Alcalá del Río, Sevilla).

3.6. Determinación de las actividades enzimáticas en hojas de maíz

3.6.1. Medida de la actividad enzimática de la β -1,3-glucanasa

La β -1,3-glucanasa es una enzima capaz de hidrolizar los enlaces β -1,3 que mantienen la estructura de los glucanos como la laminarina, sustrato de esta reacción. Al degradar dicha molécula, se liberaron glucosas que se cuantificaron mediante el ensayo que se explica a continuación.

Para la determinación de la actividad enzimática se realizó una extracción enzimática. Se tomaron 0.5 g de hoja congelada, y se trituraron con un mortero añadiendo 1 ml de tampón de extracción que contenía tampón fosfato sódico 0.1 M (pH 7,0), PMSF 0.5 M y 5 μ l de β -mercaptoetanol. El homogenado se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación enzimática de la β -1,3-glucanasa.

Para medir la actividad enzimática se utilizó el protocolo descrito por Kini et al. (2000) con algunas modificaciones [25]. Se prepararon 2 tubos por cada muestra, uno de ellos contenía una mezcla de tampón acetato-acético 50 mM pH 5.5 y 50 μ l de sobrenadante (tubo control), y otro contenía laminarina 0.5% (w/v) en tampón acetato-acético 50 mM pH 5.5 y 50 μ l de sobrenadante (tubo con sustrato). Estos se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Seguidamente se añadió a los tubos ácido dinitrosalicílico o DNS (ácido dinitrosalicílico 1%, fenol 0.2%, sulfito sódico 0.05% y NaOH 1%) y, tras incubarlos a 95°C durante 5 minutos, se añadió tartrato de sodio potasio al 40% [26]. Las muestras se enfriaron, y se midió la absorbancia de las distintas muestras en un espectrofotómetro a 575 nm. Para el análisis de la actividad enzimática se utilizó como referencia una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de glucosa. La actividad específica se expresó como mg de glucosa liberados por minuto y por mg de proteína.

3.6.2. Medida de la actividad enzimática de la quitinasa

La quitinasa es una enzima capaz de hidrolizar las moléculas de quitina, uno de los componentes principales de las paredes de los hongos. En este caso su actividad se determinó utilizando el sustrato específico fluorescente 4-metilumbeliferil-N,N,N-triacetilquitotriosa, que al degradarse da lugar a umbeliferona, producto que se cuantificó mediante el uso de un fluorímetro.

La actividad enzimática se determinó sustrato indicado según se describe en Dana *et al.* (2006) [27]. El ensayo contenía 80 μ l del sobrenadante del extracto crudo de hoja, obtenido según se detalla en el apartado 3.6.1., y 250 μ M de sustrato fluorescente en 100mM de tampón citrato de sodio pH 3,0. Este ensayo se realizó en placas multipocillos opacas, las cuales se incubaron durante 30 minutos a 30°C en oscuridad. Posteriormente, la reacción se detuvo con 100 μ l de glicina 0,5M (pH 10,4). La cantidad de sustrato liberado se midió en un fluorímetro con excitación a 350 nm y emisión a 440 nm (lector de placas Biotek, *synergy*, Servicio de Biología (Citius)). Se realizó una curva patrón utilizando concentraciones conocidas de 4-metilumbeliferona. La actividad específica de la quitinasa se expresó en picomoles de producto liberados por minuto y por μ g de proteína.

4. Determinación de proteínas solubles

La cantidad de proteína contenida en los extractos crudos obtenidos de hojas se realizó mediante el método Bradford [28].

Las determinaciones de las actividades enzimáticas se realizaron en el departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Facultad de Biología (Área de Fisiología Vegetal).

5. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa *Stadistix 10*. Los datos se compararon entre sí mediante la realización de un análisis de varianza (ANOVA), seguido de un test para comparar la diferencia de medias (LSD).

RESULTADOS

1. Actividad fungistática del extracto de microalga

La actividad fungistática se calculó como se indica en el apartado 2.1. de materiales y métodos.

En el caso de *A. flavus*, no se vieron diferencias significativas en el nivel de inhibición entre las distintas dosis de alga. En el caso de los tratamientos al 1% y al 0,1%, se obtuvieron valores de inhibición negativos, por lo que el crecimiento del hongo se vio fomentado. En el caso de las concentraciones restantes, la de 0,5% muestra un porcentaje de inhibición ligeramente mayor que la de 0,05% (datos no mostrados).

Para inhibir el crecimiento *in vitro* de *A. parasiticus*, la concentración del extracto de alga al 1% parece ser la más eficaz, seguida por los tratamientos al 0,1% y al 0,05%, siendo el tratamiento de 0,5% el menos eficaz, aunque ninguna de estas diferencias es realmente significativa. En este caso, las medias demostraron que todos los tratamientos inhibían el desarrollo del hongo (datos no mostrados).

Tanto en *F. proliferatum* como en *F. verticillioides*, la presencia de las distintas concentraciones de alga incrementó el halo de crecimiento en placa. El análisis de los datos demostró que no existían diferencias significativas entre la eficacia de las distintas dosis (datos no mostrados).

En la Figura 2 se compara el crecimiento *in vitro* del hongo en ausencia y en presencia de las distintas concentraciones del extracto:

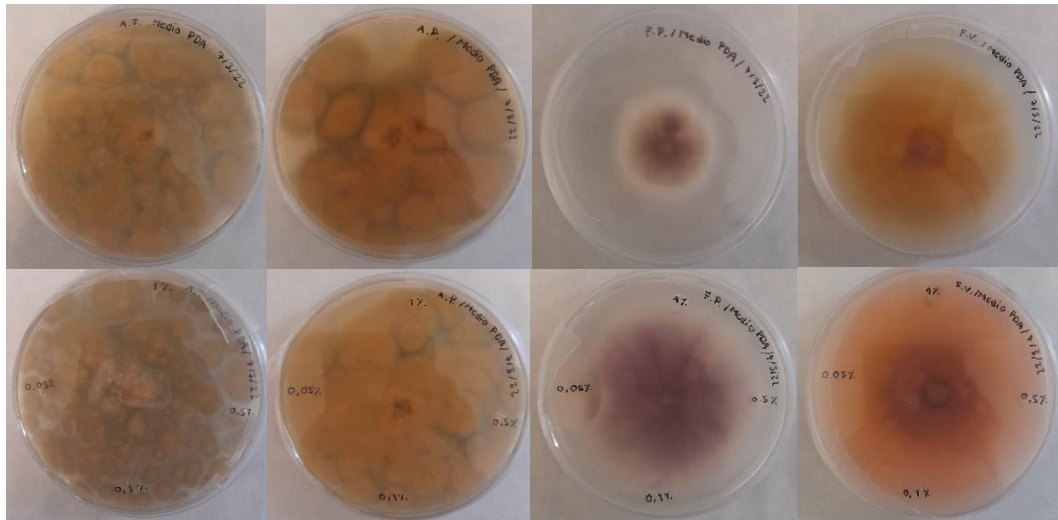


Figura 2. Actividad fungistática de distintas concentraciones de extracto de microalga frente a distintos hongos micotoxigénicos en placa con medio PD., La fila superior contiene las imágenes correspondientes a las placas control (sin extracto de microalga), mientras que en la fila inferior se muestran las placas con las distintas concentraciones del extracto (1%, 0,5%, 0,1% y 0,05%). Los hongos, de izquierda a derecha, son: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides*.

2. Actividad fungistática de la bacteria en placa

Para el estudio de las propiedades fungistáticas de la bacteria se utilizaron placas de Petri con medio TSB, donde se comparó el crecimiento de un botón del hongo de interés en presencia de *B. amyloliquefaciens* con el halo de crecimiento del hongo en ausencia de dicho microorganismo (Fig. 3). Se calculó el porcentaje de inhibición como se indica en el apartado 2.1. de materiales y métodos.

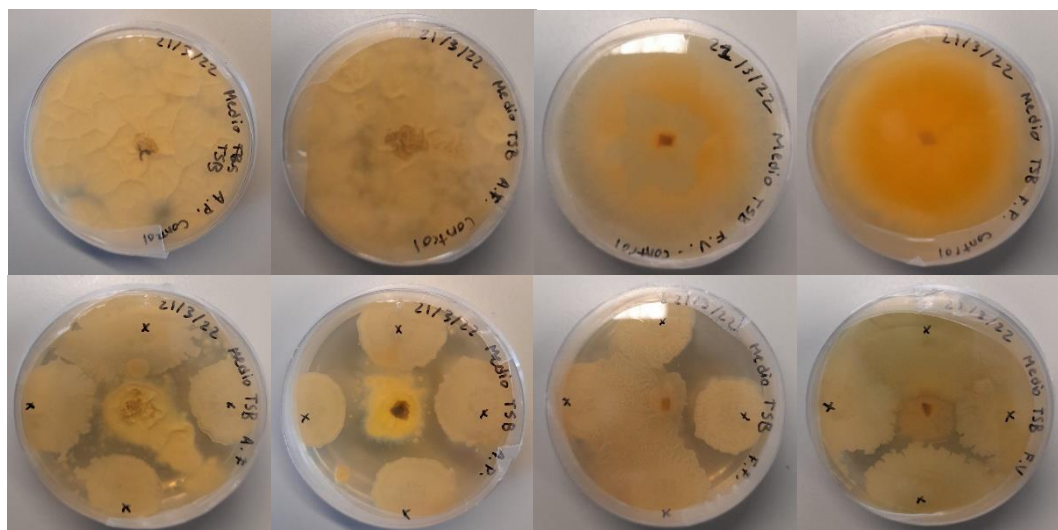


Figura 3. Actividad fungistática de *Bacillus amyloliquefaciens* frente a distintos hongos micotoxigénicos en placa con medio TSB. La fila superior contiene las imágenes correspondientes a las placas control (sin bacteria), mientras que en la fila inferior se muestran las placas con los cuatro puntos (marcados con una x) en los que se posicionó la bacteria. Los hongos, de izquierda a derecha, son: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium verticillioides*.

En todas las especies estudiadas se observó un porcentaje de inhibición que superaba el 70%, siendo *Fusarium proliferatum* el patógeno más afectado por la presencia del microorganismo (Fig. 4). No hubo diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de los distintos hongos.

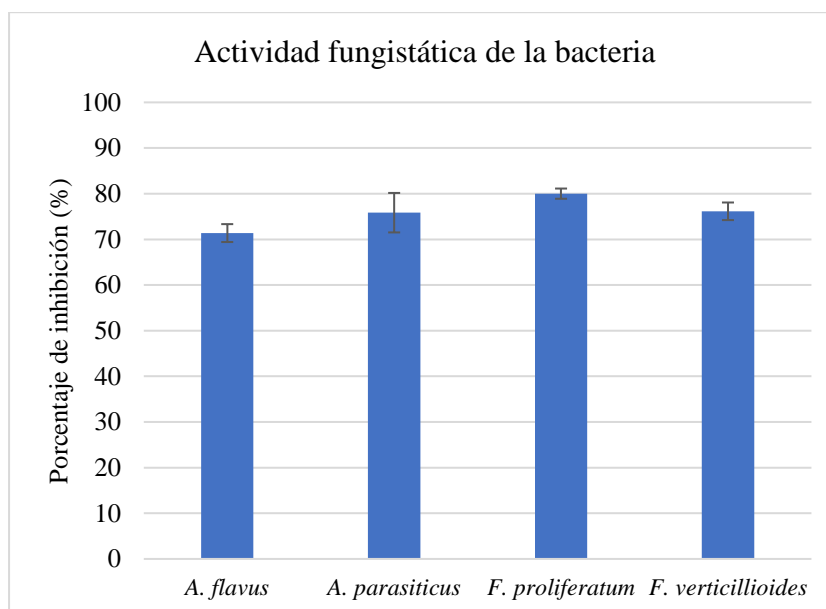


Figura 4. Actividad fungistática de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre el crecimiento de distintas especies de hongos micotoxigénicos. Este carácter se mide como porcentaje de inhibición en placa (%). Las barras de error indican la desviación estándar de los datos.

3. Actividad fungistática de las plantas biocidas

Los 5 tratamientos compuestos por distintas combinaciones de brasicas (*Nemaredux*, *Nitrafix*, *Vitaro*, *Biofum*, *Fungiredux*) se enfrentaron a distintos hongos de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* con el fin de observar el potencial antifúngico de los compuestos volátiles generados por dichas plantas al ser trituradas.

No se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos a la hora de inhibir a *A. flavus*, pero, en el caso de *A. parasiticus*, el tratamiento *Nitrafix* resultó significativamente más eficaz que los demás tratamientos, mientras que los resultados sugieren que *Nemaredux* es el tratamiento menos eficaz frente a esta especie (Fig. 5).

Todos los tratamientos fueron efectivos para retrasar el crecimiento de *F. proliferatum*, y no se detectaron diferencias significativas entre los datos obtenidos. De la misma forma, el crecimiento de *F. verticillioides* fue inhibido por todos los tratamientos, siendo *Fungiredux* y *Vitaro* significativamente menos eficaces que los demás (Fig. 5).

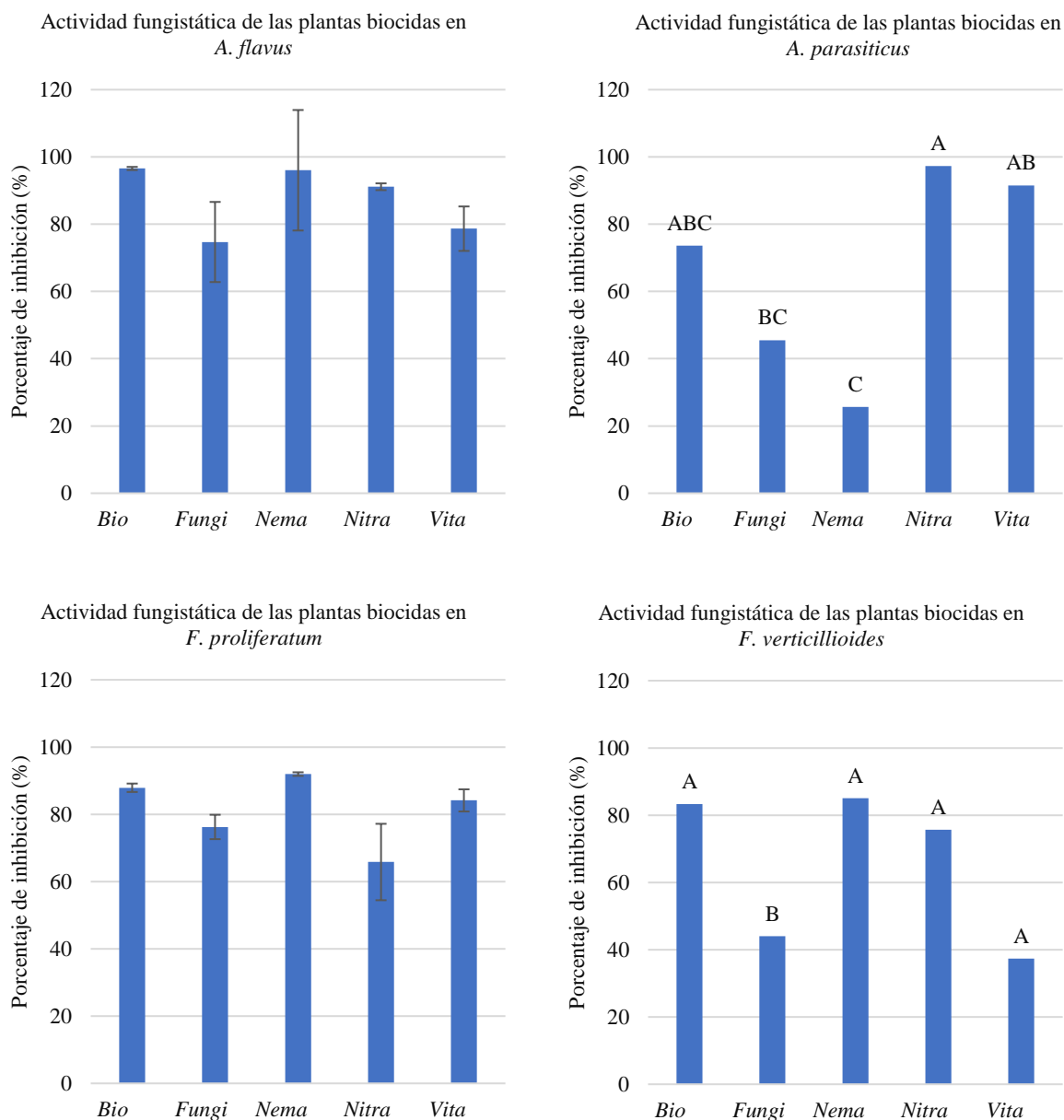


Figura 5. Actividad fungistática de los distintos tratamientos de plantas biocidas sobre el crecimiento de distintos hongos micotoxigénicos. Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: *Bio* (*Biofum*), *Fungi* (*Fungiredux*), *Nema* (*Nemaredux*), *Nitra* (*Nitrafix*) y *Vita* (*Vitaro*). Se midió el porcentaje de inhibición en placa (%) provocado por los compuestos volátiles generados por la mezcla de plantas trituradas. Las distintas letras indican diferencia significativa con $P < 0.05$. Las barras de error indican la desviación estándar de los datos.

4. Ensayo con plantas de maíz

Se realizó un ensayo con plantas de maíz en el que se diseñaron 7 tratamientos distintos (Tabla 2). A pesar de los resultados obtenidos al observar la interacción entre los hongos del género *Fusarium* y las distintas concentraciones de extracto de microalga en placa, se quiso estudiar la eficacia del extracto *in vivo*.

4.1. Efecto de los distintos tratamientos sobre el incremento de altura

Para el estudio de este carácter se realizó una comparación del incremento en altura de las plantas tratadas con las distintas concentraciones de extracto, y también se comparó el desarrollo vegetal atendiendo a la presencia o ausencia del hongo.

La inoculación con *F. verticillioides* provocó una disminución en el incremento de altura en aquellas plantas no tratadas con extracto de microalga. Al comparar estas plantas con las plantas control (sin extracto de microalga, no inoculadas con el patógeno), se determinó que las plantas infectadas presentaban una altura significativamente menor que las plantas control, lo que sugiere que un efecto de la inoculación con el hongo es un menor desarrollo en altura de la planta.

La aplicación del extracto de microalga al 0,5% en las plantas no inoculadas con el hongo redujo significativamente el crecimiento de las plantas. En las inoculadas, la aplicación de las distintas concentraciones de extracto no repercutió de manera significativa sobre la altura de las plantas, aunque se observó un ligero aumento del desarrollo en las tratadas con el extracto al 0,5% con respecto al control inoculado (sin extracto de alga).

En definitiva, la aplicación de los distintos tratamientos con el extracto de microalga provocó una disminución en el crecimiento de las plantas no inoculadas con el patógeno. Sin embargo, dichos tratamientos resultaron efectivos en aquellas plantas infectadas con *F. verticillioides*, pues lograron mitigar el principal síntoma derivado de la enfermedad, que es la disminución del incremento de la altura (Fig. 6).

Las plantas inoculadas con *B. amyloliquefaciens* y con *F. verticillioides* se compararon con las plantas control inoculadas y no inoculadas con hongo (ambas sin extracto de alga). Se observaron diferencias significativas entre los tres grupos, siendo aquellas plantas inoculadas con la bacteria las que presentaron un mayor incremento en altura. De nuevo, se muestra como el crecimiento de las plantas inoculadas con el patógeno presentan un crecimiento disminuido con respecto a las no infectadas. La presencia de la bacteria fomenta significativamente el crecimiento en altura de las plantas de maíz con respecto a los demás tratamientos (Fig. 7).

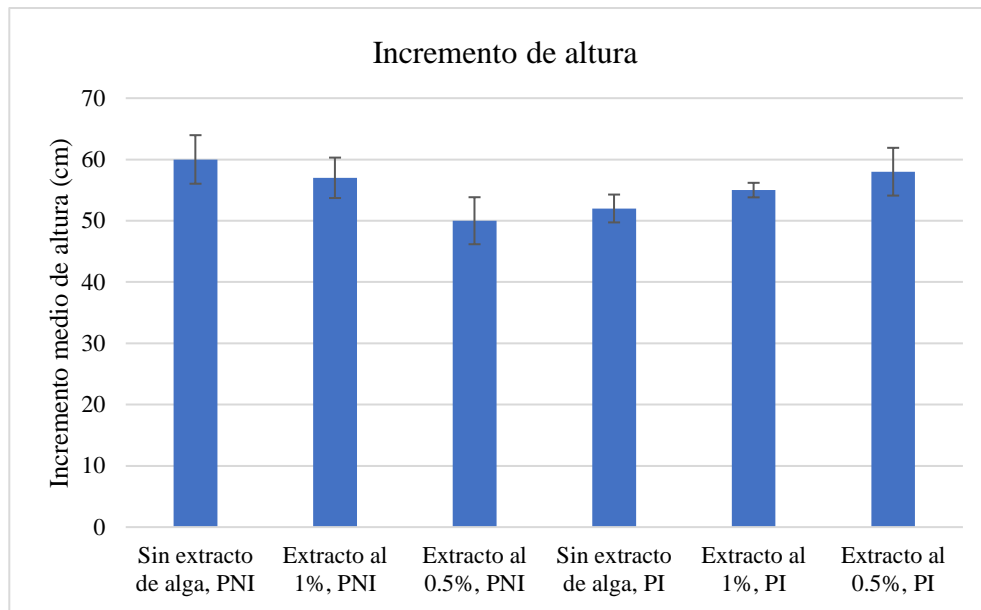


Figura 6. Comparación del incremento de la altura en cm de las plantas de maíz no inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) con *F. verticillioides* según la concentración del extracto de algas aplicado. Las medidas fueron tomadas de forma periódica a lo largo del ensayo (11 semanas) desde la base del tallo hasta el ápice de la hoja de mayor altura. Las barras de error indican la desviación estándar de los datos.

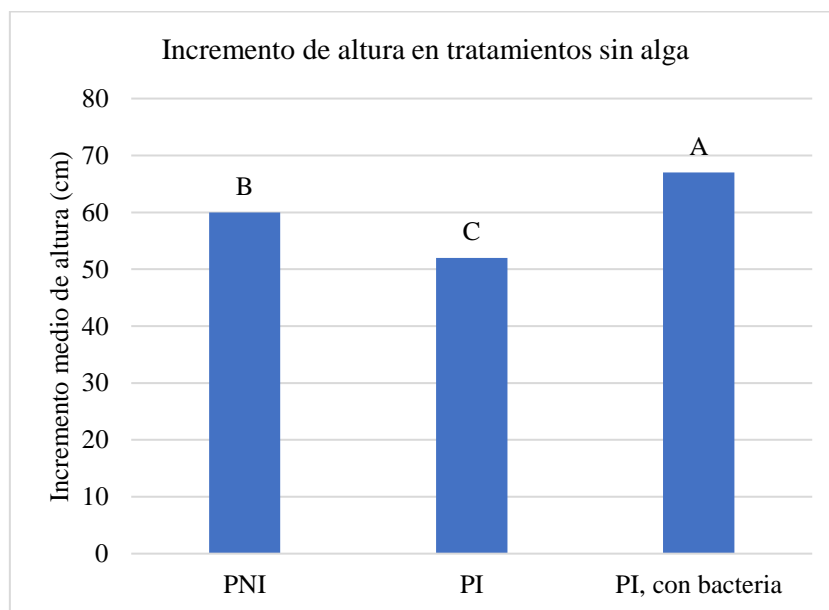


Figura 7. Comparación del incremento de la altura de las plantas de maíz no tratadas con extracto de alga. Se muestran los datos obtenidos en las plantas no inoculadas con *F. verticillioides*, y en las inoculadas con el hongo, tanto en presencia como en ausencia de *B. amyloliquefaciens*. Las medidas fueron tomadas de forma periódica a lo largo del ensayo (11 semanas) desde la base del tallo hasta el ápice de la hoja de mayor altura. Las letras indican diferencia significativa con $P < 0,05$.

4.2. Efecto de los distintos tratamientos sobre el peso aéreo

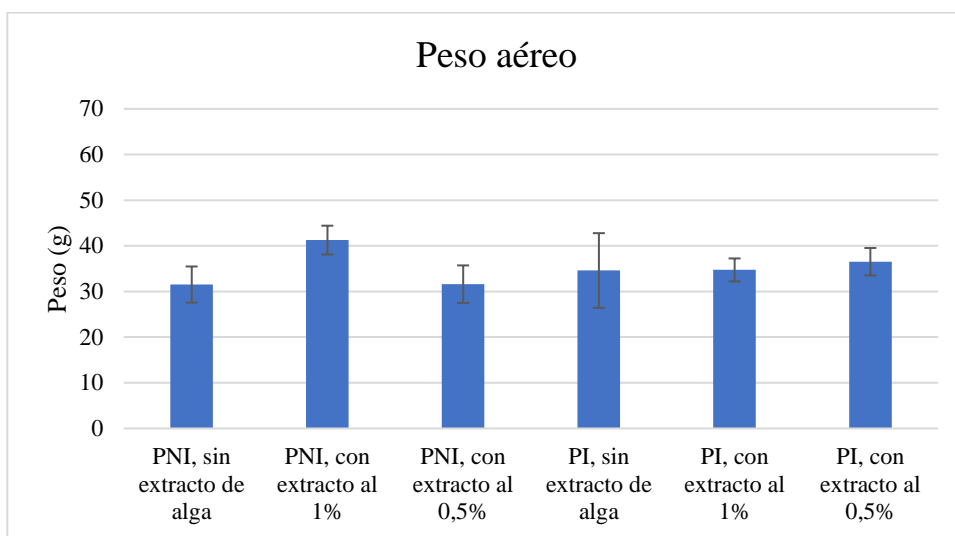


Figura 8. Comparación del peso aéreo de los distintos tratamientos aplicados a las plantas de maíz. Las medidas se tomaron al final del ensayo (11 semanas), tras separar la parte aérea de la parte radicular de la planta, y pesarlas por separado. Las barras de error indican la desviación estándar de los datos.

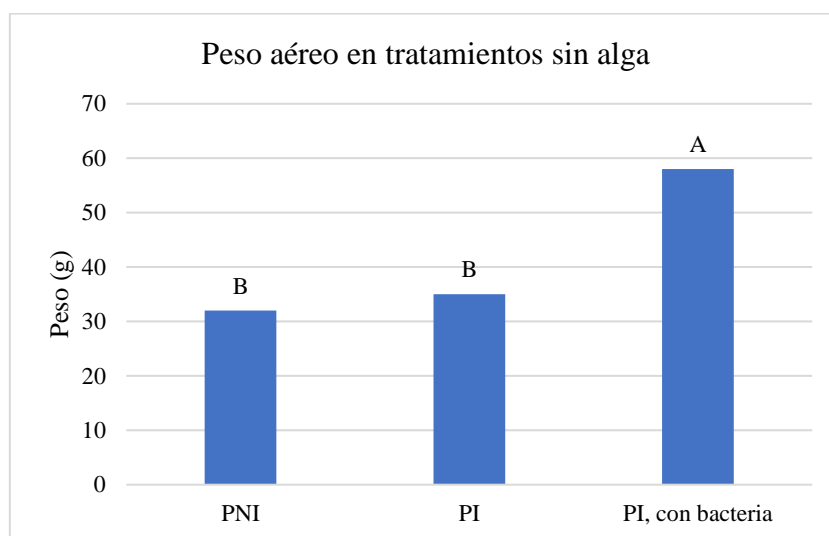


Figura 9. Comparación del peso aéreo de los distintos tratamientos sin extracto de alga aplicados a las plantas de maíz. Las medidas se tomaron al final del ensayo (11 semanas), tras separar la parte aérea de la parte radicular de la planta, y pesarlas por separado. Las letras indican diferencia significativa con $P < 0,05$.

En este estudio se ha determinado la biomasa aérea. En las plantas no inoculadas, la aplicación del extracto de microalga al 1% tiende a favorecer el desarrollo en peso de la parte aérea de la planta y, dentro de las inoculadas, el extracto al 0,5% parece aumentar ligeramente los valores de este carácter. En plantas sin extracto, la inoculación con *F. verticillioides* parece fomentar el aumento de peso de la parte aérea. En cualquier caso, no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Fig. 8)

La inoculación de *B. amyloliquefaciens* en la rizosfera de las plantas de maíz provoca un incremento significativo en el peso aéreo de las plantas (Fig. 9), siendo este el único factor que modifica significativamente la variable de estudio.

4.3. Efecto de los distintos tratamientos sobre el peso radicular

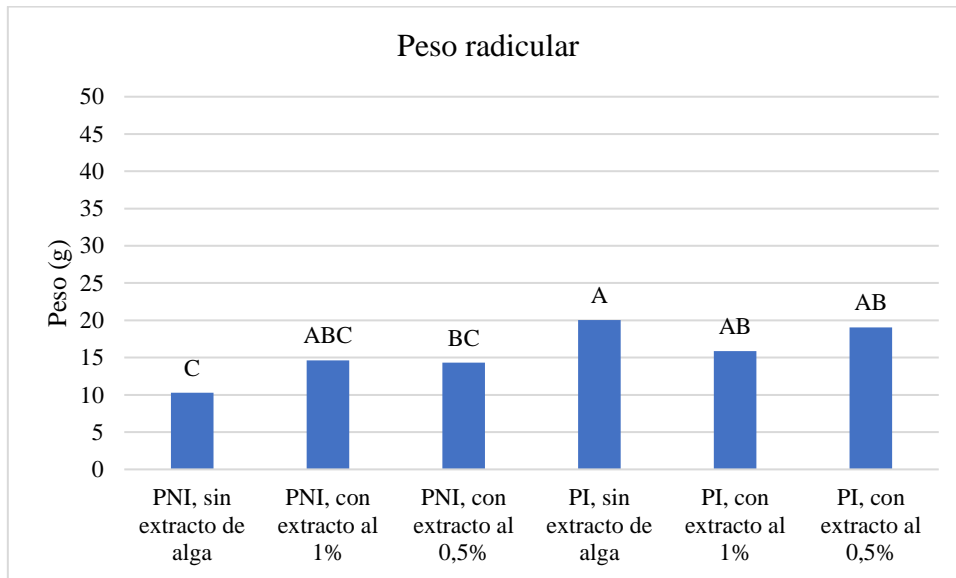


Figura 10. Comparación del peso radicular de los distintos tratamientos aplicados a las plantas de maíz. Las medidas se tomaron al final del ensayo (11 semanas), tras separar la parte aérea de la parte radicular de la planta, y pesarlas por separado. Las letras indican diferencia significativa con $P < 0,05$.

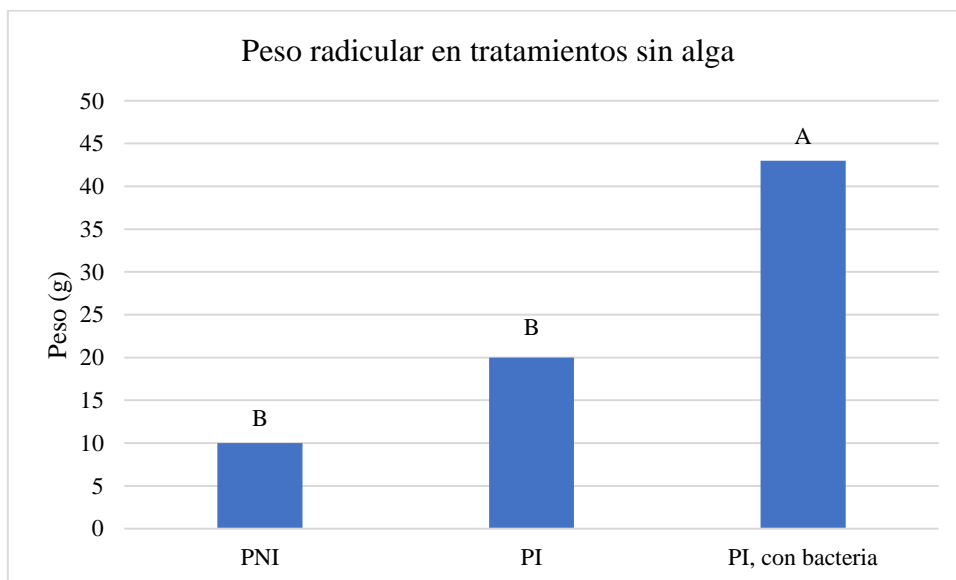


Figura 11. Comparación del peso radicular de los distintos tratamientos sin extracto de alga aplicados a las plantas de maíz. Las medidas se tomaron al final del ensayo (11 semanas), tras separar la parte aérea de la parte radicular de la planta, y pesarlas por separado. Las letras indican diferencia significativa con $P < 0,05$.

El análisis de los datos de biomasa radicular muestra como la inoculación con *F. verticillioides* aumenta significativamente el peso de la raíz. Con respecto al efecto de los extractos, en el caso de las plantas no inoculadas, la aplicación de ambas dosis del extracto de microalga va a aumentar ligeramente el peso radicular de las plantas, mientras que, en el caso de las inoculadas, los extractos tienden a disminuir el desarrollo radicular (Fig. 10).

La inoculación de *B. amyloliquefaciens* vuelve a tener un efecto favorable en el crecimiento de las plantas de maíz, ya que provoca un incremento significativo en el peso radicular de las plantas (Fig. 11).

4.4. Actividad específica de la β -1,3-glucanasa

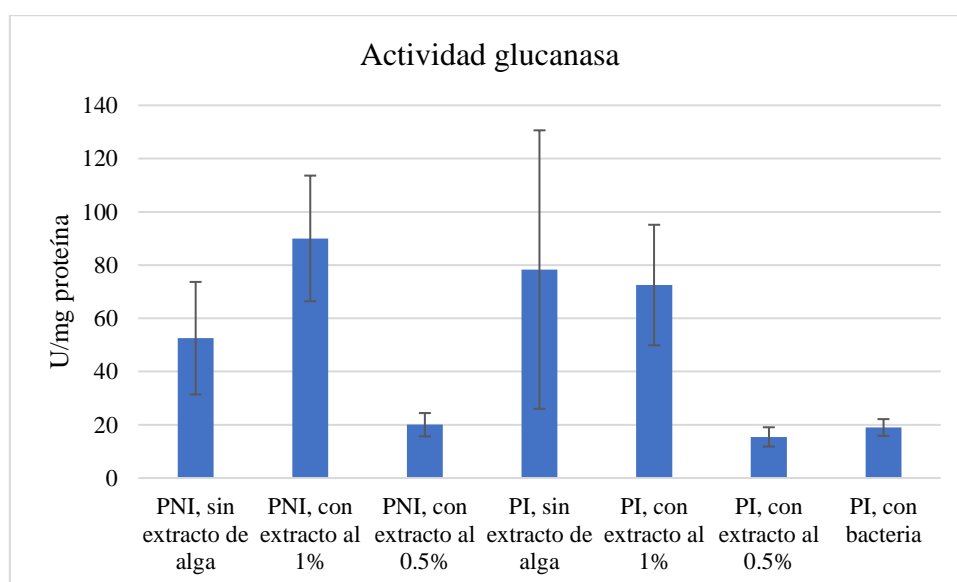


Figura 12. Comparación de la actividad específica (U/mg proteína) de la β -1,3-glucanasa en hojas de plantas de maíz no inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) con *F. verticillioides*, y tratadas con distintas concentraciones de extracto de microalga e inóculo de *B. amyloliquefaciens*. Las hojas se recolectaron al final del ensayo (11 semanas). Las barras de error indican la desviación estándar de los datos.

Esta enzima ejerce un importante papel en la defensa de las plantas frente al ataque de hongos patógenos, es por eso por lo que nos planteamos estudiar su presencia en los tejidos de la planta, concretamente en la hoja.

Al analizar los datos correspondientes de la actividad específica de la enzima β -1,3-glucanasa medida en los distintos tratamientos, y a pesar de lo mucho que difieren los resultados obtenidos, el ANOVA indica que no hay diferencias significativas entre los distintos conjuntos de datos. A pesar de que dichas diferencias no son significativas, se observan ciertas tendencias: dentro de las plantas no inoculadas, aquellas tratadas con

extracto de alga al 1% son las que presentan mayor actividad β -1,3-glucanasa, mientras que las tratadas con extracto al 0,5% tienen menos actividad que las plantas control (sin extracto de alga). Las plantas inoculadas sin extracto poseen mayor actividad específica de la enzima y, de nuevo, la aplicación del extracto al 0,5% también reduce la presencia de la enzima. La inoculación con *B. amyloliquefaciens* hace que la actividad glucanasa sea menor que en las plantas sin extracto de microalgas (Fig. 12)

4.5. Actividad específica de la quitinasa

La enzima quitinasa también está implicada en la respuesta de defensa de la planta, ya que se encarga de hidrolizar la pared del hongo. Al cuantificar su actividad, no se observaron diferencias significativas, pero sí que hay ciertas tendencias en los conjuntos de datos analizados. Las plantas sin inocular poseen una mayor actividad enzimática. Tanto en las plantas inoculadas como en las no inoculadas, las que no llevan extracto de alga presentan mayor actividad quitinasa, mientras que las tratadas con alga al 0,5% parecen tener más actividad que las que llevan extracto al 1%. En este caso, las plantas de maíz inoculadas con bacteria presentan un nivel de actividad similar a las plantas control inoculadas y no inoculadas (Fig. 13).

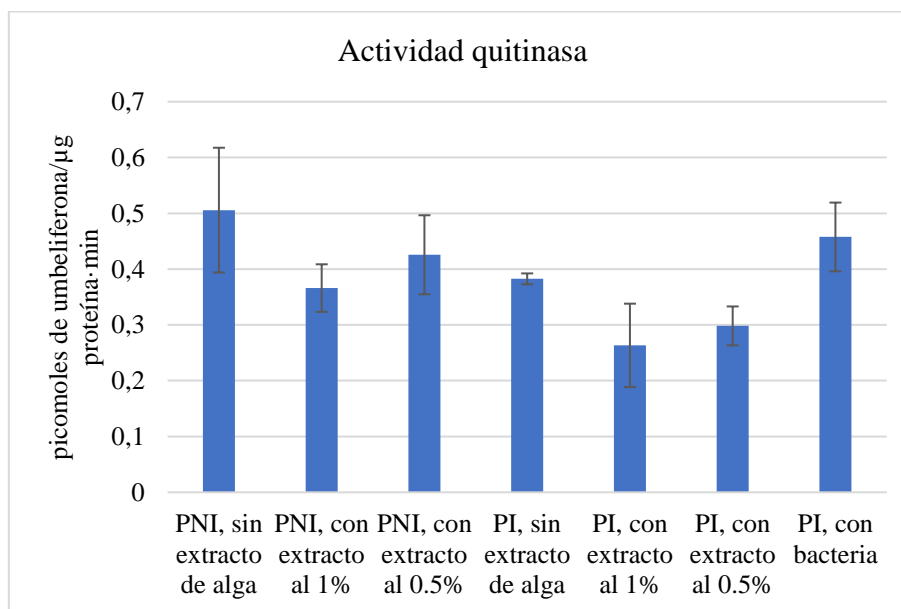


Figura 13. Comparación de la actividad específica (picomoles de umbeliferona/μg proteína·minuto) de la quitinasa en hojas de plantas de maíz no inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) con *F. verticillioides*, y tratadas con distintas concentraciones de extracto de microalga e inóculo de *B. amyloliquefaciens*. Las hojas se recolectaron al final del ensayo (11 semanas). Las barras de error indican la desviación estándar de los datos.

DISCUSIÓN

1. Actividad fungistática de las algas *in vitro*

En el ensayo realizado, se ha demostrado que el extracto de microalga utilizado no ha resultado ser efectivo para la inhibición del crecimiento de las especies de *Aspergillus* y *Fusarium* estudiadas a nivel de placa. Sin embargo, esto no significa que dichas algas no puedan inhibir el crecimiento de otros patógenos, ya que la actividad fungistática de las microalgas va a depender tanto de la especie de microalga utilizada como del hongo a tratar. En el caso de la microalga *Nannochloropsis sp.*, su aplicación puede fomentar el crecimiento relativo de determinados hongos patógenos, así como también disminuir el desarrollo de otros. También puede controlar la infección de distintas especies de *Fusarium* en plantas de maíz no solo *in vitro*, sino también en campo, siendo sus extractos fenólicos más eficaces inhibiendo la producción de fumonisina que otros fungicidas perjudiciales como el tebuconazol [13, 18].

2. Actividad fungistática de la bacteria *in vitro*

El género *Bacillus* se compone de numerosas especies capaces de inhibir el crecimiento de diversos hongos filamentosos. Los resultados obtenidos en este estudio confirman la capacidad de la bacteria *B. amyloliquefaciens* de retrasar el desarrollo de los patógenos estudiados.

Este microorganismo es capaz de interferir en el metabolismo y la estructura de patógenos del género *Aspergillus*, inhibiendo notablemente su crecimiento y la producción de aflatoxinas al suprimir la expresión de genes implicados en su síntesis. Los resultados obtenidos en este trabajo, a pesar de mostrar una inhibición de los hongos del género ligeramente menor que los publicados en las referencias, son muy prometedores, ya que en ambas especies se llega a inhibir más del 70% del crecimiento [29, 30].

También se ha demostrado como la bacteria llega a inhibir el crecimiento de los hongos *F. proliferatum* y *F. verticillioides* en un 57% y un 59% respectivamente. En el caso de *Fusarium*, en este ensayo se han alcanzado valores de inhibición mayores, ya que en ambas especies se ha superado el 70% de inhibición, alcanzando el 80% en *F. proliferatum* [31, 32].

3. Actividad fungistática de las plantas biocidas en placa

Todos los tratamientos compuestos por distintas plantas del orden *Brassicales* han resultado ser efectivos a la hora de inhibir el crecimiento de los distintos hongos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. Estas plantas deben su actividad antifúngica a la presencia de glucosinolatos, los cuales al hidrolizarse a isotiocianatos van a actuar sobre los patógenos. Previamente se ha observado como las plantas de este género también son buenos métodos de control biológico frente a diversas bacterias patógenas. A pesar de los positivos resultados obtenidos *in vitro*, hay que tener en cuenta que distintos artículos indican que la efectividad del uso de estas plantas para controlar la infección por hongos patógenos en cultivo no siempre es la misma, ya que dependerá del hongo a tratar, del estado de la planta (edad, tejido utilizado), y de los tipos y cantidades de isotiocianatos que la planta genera [33-35].

4. Efecto de los diferentes tratamientos sobre las plantas de maíz

4.1. Efecto sobre el crecimiento vegetal

A pesar de que publicaciones anteriores han demostrado que la infección por *F. verticillioides* puede provocar pudrición en el maíz, especialmente a nivel de raíz, en otros casos no se observa ninguna sintomatología de ese tipo en las plantas infectadas, al igual que ha ocurrido en este caso [36, 37].

Las plantas inoculadas con el patógeno presentan un menor crecimiento en altura que las plantas control (no inoculadas), lo cual es un síntoma común de la infección por *F. verticillioides*. En cuanto al peso aéreo, no existen diferencias significativas entre las plantas inoculadas y no inoculadas por el hongo. Según resultados publicados anteriormente, las plantas inoculadas con este patógeno suelen presentar una reducción de un 43% en su peso aéreo y del 47% en su peso radicular, lo cual difiere de los resultados obtenidos en este caso [38].

La inoculación con *B. amyloliquefaciens* ha inhibido por completo el retraso en el crecimiento provocado por el patógeno, de hecho, ha favorecido significativamente el desarrollo vegetal. Estudios previos demuestran la capacidad de este microorganismo para el control de la colonización de diversos hongos, llegando a ser más efectiva que fungicidas comerciales como el clorotalonil. Según Xie *et al.* (2022) [39], las plantas de maíz, al ser infectadas por hongos patógenos, van a producir una serie de exudados a nivel de raíz que van a promover una reacción de quimiotaxis en *B. amyloliquefaciens*. De esta forma, la bacteria va a formar un biofilm que impedirá el desarrollo del hongo, en este

caso *F. graminearum*, mediante la producción de lipopéptidos como las iturinas, compuestos con una fuerte actividad antibiótica.

Este microorganismo presenta un excelente rendimiento como promotor del crecimiento vegetal, llegando a aumentar el peso aéreo en más de un 60%. Estos resultados no solo se han obtenido a nivel de maceta, pues la bacteria parece ser también eficaz al emplearla en el campo. Aunque aún no se conocen en profundidad los mecanismos moleculares por los que la bacteria promueve el crecimiento, ensayos *in vitro* han demostrado que este bacilo es capaz de promover la fijación de nitrógeno y de solubilizar macroelementos como el fosfato o el potasio, los cuales son esenciales para un buen desarrollo de las plantas de maíz. Su capacidad para la producción de fitohormonas como las giberelinas, implicadas en el crecimiento, también explica el efecto de la bacteria sobre el crecimiento en altura de las plantas. Además, activan una serie de enzimas asociadas a la calidad del suelo, que también van a mejorar el rendimiento de la cosecha [40-42].

4.2. Efecto sobre la actividad β -1,3-glucanasa y quitinasa

Las plantas han desarrollado mecanismos para degradar las paredes de los hongos patógenos, como la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas como la β -1,3-glucanasa o la quitinasa. Estas se sintetizan simultáneamente, lo que sugiere que la eficiencia con la que se enfrentan al patógeno depende de la acción de ambas actividades [10].

En los resultados de este estudio, se muestra como la actividad específica de la β -1,3-glucanasa aumenta al inocular con *F. verticillioides* en las plantas no tratadas con alga con respecto al control no inoculado (sin extracto de alga), lo que coincide con lo descrito en el párrafo anterior. Existen distintas microalgas cuya aplicación va a favorecer también la síntesis de esta enzima, como se muestra en la publicación de Farid *et al.* (2018) [43], donde los resultados indican que la aplicación de distintas cepas de microalgas puede inducir la actividad de esta enzima en plantas de tomate, así como otras actividades importantes para el desarrollo de la planta. La aplicación de extracto de microalgas al 1% ha dado buenos resultados en el ensayo, pero, en plantas infectadas, se observa mayor actividad en aquellas plantas sin extracto. En ambos casos, el extracto al 0,5% no resulta efectivo.

El uso de las algas como inductoras de la respuesta de defensa en plantas está muy extendido. Parece que algunos de los compuestos responsables de este efecto son polisacáridos presentes en el organismo, como la laminarina o los carragenanos, que

además de favorecer la síntesis de la β -1,3-glucanasa, también aumentan la producción de la quitinasa [44].

Los resultados indican que la actividad β -1,3-glucanasa es menor en las plantas inoculadas con bacteria que en los demás tratamientos. En cambio, se ha estudiado como la aplicación de otras bacterias del género han aumentado notablemente los niveles de actividad glucanasa en la rizosfera. Es importante resaltar que en la mayoría de las publicaciones que estudian los efectos de las bacterias del género *Bacillus* sobre la actividad glucanasa, dicha actividad enzimática se mide directamente en la bacteria, no en la planta como se ha realizado en este trabajo. Estas bacterias no solo son capaces de sintetizar esta enzima, sino que también producen diversos compuestos que también ayudan a impedir el desarrollo de la infección por parte de hongos del género *Fusarium*, como pueden ser sideróforos, proteasas o surfactinas. Es probable que no se hayan detectado valores más elevados de esta actividad debido a que se ha medido en hojas en lugar de en la rizosfera [45, 46].

La actividad quitinasa se ve reducida en las plantas inoculadas con *F. verticillioides* con respecto a las plantas no inoculadas (sin alga). A pesar de que, como se ha descrito anteriormente, la actividad de esta enzima suele aumentar ante este tipo de infecciones, se ha demostrado que algunas especies del género *Fusarium* secretan una proteasa capaz de inhibir la actividad de ciertos tipos de quitinasas, lo que puede explicar el hecho de que en este caso la actividad quitinasa en plantas con infección sea menor que en plantas sanas [7].

La aplicación foliar de las algas parece disminuir también esta actividad, aunque publicaciones anteriores muestran como el uso de distintos extractos de estos organismos incrementan la actividad de esta enzima en plantas de tomate, lo cual difiere de los resultados obtenidos [47, 48].

La aplicación de distintas bacterias del género *Bacillus* en plantas de tomate han resultado ser efectivas para el control de la infección por el género *Fusarium*, y una de las vías por las que se controla el proceso patogénico es la producción de quitinasa, lo cual concuerda con los datos obtenidos en este ensayo, pues los valores de actividad específica de la quitinasa en plantas inoculadas con hongo y bacteria se asimilan bastante a los obtenidos para las plantas control (no inoculadas, sin extracto de alga), y además son más elevados que en los demás tratamientos [45, 49, 50].

CONCLUSIONES

1. El uso de distintas concentraciones de extracto de microalga no tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento en placa de los hongos micotoxigénicos de los géneros *Aspergillus* (*A. flavus* y *A. parasiticus*) y *Fusarium* (*F. proliferatum* y *F. verticillioides*), llegando a favorecer su desarrollo en la mayoría de los casos.
2. La presencia de *B. amyloliquefaciens* inhibe notablemente el crecimiento fúngico en placa, llegando a superar en todos los casos un porcentaje de inhibición de hasta el 70%.
3. Los compuestos volátiles liberados por los distintos tratamientos de plantas biocidas del género *Brassica* han generado resultados favorables en todos los casos. Todos ellos inhiben el crecimiento fúngico de las distintas especies, lo que convierte a dichos tratamientos en unos excelentes métodos de control de estos organismos.
4. La inoculación con *F. verticillioides* provoca un retraso en el crecimiento de las plantas infectadas. Este síntoma puede mitigarse mediante la aplicación de extracto de microalga al 0,5%, y con la aplicación de la bacteria *B. amyloliquefaciens*, ya que provocan un aumento en el desarrollo vegetal, estimulando tanto la altura como el peso aéreo y radicular.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2011). *Cultivos herbáceos, Vol. I, Cereales*.
- [2] Eugenia De La Torre-Hernández, M., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., & Plasencia-de La Parra, J. (2014). Fumonisin – Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP*, 17(1), 77–91.
- [3] Krska, R., Welzig, E., & Boudra, H. (2007). Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3–4), 241–264.
- [4] Smith, L. E., Stoltzfus, R. J., & Prendergast, A. (2012). Food Chain Mycotoxin Exposure, Gut Health, and Impaired Growth: A Conceptual Framework. *Advances in Nutrition*, 3(4), 526–531.
- [5] Iqbal, N., Czékus, Z., Poór, P., & Ördög, A. (2021). Plant defence mechanisms against mycotoxin Fumonisin B1. *Chemico-Biological Interactions*, 343, 109494.
- [6] Gutiérrez-Nájera, N., Muñoz-Clares, R. A., Palacios-Bahena, S., Ramírez, J., Sánchez-Nieto, S., Plasencia, J., & Gavilanes-Ruíz, M. (2005). Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 221(4), 589–596.
- [7] Naumann, T. A., Wicklow, D. T., & Price, N. P. (2011). Identification of a Chitinase-modifying Protein from *Fusarium verticillioides*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 35358–35366.
- [8] Sánchez-Rangel, D., Sánchez-Nieto, S., & Plasencia, J. (2011). Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize β -1,3-glucanase activities involved in defense response. *Planta*, 235(5), 965–978.
- [9] Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M., & Dixon, R. A. (1989). Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, 56(2), 215–224.
- [10] Menéndez, E., Navarro, J., López, J., & Dalmau, A. (2020). Mecanismos de defensa en plantas. Proteínas relacionadas con la patogenicidad. *Revista de Investigaciones de la Universidad Le Cordon Bleu*, 7(2), 98–109.
- [11] Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205.
- [12] El-Sheekh, M. M., Mousa, A. S. H., & Farghl, A. A. M. (2020). Biological Control of *Fusarium* Wilt Disease of Tomato Plants Using Seaweed Extracts. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 45(6), 4557–4570.
- [13] Schmid, B., Coelho, L., Schulze, P. S., Pereira, H., Santos, T., Maia, I. B., Reis, M., & Varela, J. (2022). Antifungal Properties of Aqueous Microalgal Extracts. *SSRN Electronic Journal*.
- [14] Scaglioni, P. T., Blandino, M., Scarpino, V., Giordano, D., Testa, G., & Badiale-Furlong, E. (2018). Application of Fungicides and Microalgal Phenolic Extracts for the Direct Control of Fumonisin Contamination in Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(19), 4835–4841.
- [15] Scaglioni, P. T., Pagnussatt, F. A., Lemos, A. C., Nicolli, C. P., del Ponte, E. M., & Badiale-Furlong, E. (2019). *Nannochloropsis* sp. and *Spirulina* sp. as a Source of Antifungal Compounds to Mitigate Contamination by *Fusarium graminearum* Species Complex. *Current Microbiology*, 76(8), 930–938.
- [16] de Fátima Dias Diniz, G., Cota, L. V., Figueiredo, J. E. F., Aguiar, F. M., da Silva, D. D., de Paula Lana, U. G., dos Santos, V. L., Marriel, I. E., & de Oliveira-Paiva, C. A. (2021). Antifungal activity of bacterial strains from maize silks against *Fusarium verticillioides*. *Archives of Microbiology*, 204(1).

- [17] Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodríguez, M., Chulze, S., & Etcheverry, M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156(5–6), 748–754.
- [18] Ferreira, N. C., Mazzuchelli, R. D. C. L., Pacheco, A. C., Araujo, F. F. D., Antunes, J. E. L., & Araujo, A. S. F. D. (2018). *Bacillus subtilis* improves maize tolerance to salinity. *Ciência Rural*, 48(8).
- [19] Sosa, C. F., & Cotes, A. M. (1997). Evaluacion de la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* (Smith). *Revista Colombiana de Entomología*, 23(2), 107–112.
- [20] Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205.
- [21] Poveda, J., Eugui, D., & Velasco, P. (2020). Natural control of plant pathogens through glucosinolates: an effective strategy against fungi and oomycetes. *Phytochemistry Reviews*, 19(4), 1045–1059.
- [22] Vandicke, J., de Visschere, K., Deconinck, S., Leenknicht, D., Vermeir, P., Audenaert, K., & Haesaert, G. (2020). Uncovering the biofumigant capacity of allyl isothiocyanate from several *Brassicaceae* crops against *Fusarium* pathogens in maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5476–5486.
- [23] Fourie, H., Ahuja, P., Lammers, J., & Daneel, M. (2016). Brassicacea-based management strategies as an alternative to combat nematode pests: A synopsis. *Crop Protection*, 80, 21–41.
- [24] Hewitt, E. J. (1966). Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant
- [25] Kini, K.R., Vasanthi, N. & Shetty, H.S. Induction of β -1,3-glucanase in Seedlings of Pearl Millet in Response to Infection by *Sclerospora graminicola*. *European Journal of Plant Pathology* 106, 267-274 (2000).
- [26] Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- [27] Dana, M. D. L. M., Pintor-Toro, J. A., & Cubero, B. (2006). Transgenic Tobacco Plants Overexpressing Chitinases of Fungal Origin Show Enhanced Resistance to Biotic and Abiotic Stress Agents. *Plant Physiology*, 142(2), 722–730.
- [28] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- [29] Chen, G., Fang, Q., Liao, Z., Xu, C., Liang, Z., Liu, T., Zhong, Q., Wang, L., Fang, X., & Wang, J. (2022). Detoxification of Aflatoxin B1 by a Potential Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* WF2020. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- [30] Siahmoshteh, F., Hamidi-Esfahani, Z., Spadaro, D., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxinigenic *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 89, 300–307.
- [31] Alvindia, D. G., & Natsuaki, K. T. (2009). Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. *Crop Protection*, 28(3), 236–242.
- [32] Lee, T., Park, D., Kim, K., Lim, S. M., Yu, N. H., Kim, S., Kim, H. Y., Jung, K. S., Jang, J. Y., Park, J. C., Ham, H., Lee, S., Hong, S. K., & Kim, J. C. (2017). Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 Showing Potent Antifungal Activity against Mycotoxigenic *Fusarium* Species. *The Plant Pathology Journal*, 33(5), 499–507.
- [33] Guan, Y., Ramalingam, S., Nagegowda, D., Taylor, P. W. J., & Chye, M. L. (2008). Brassica juncea chitinase BjCHI1 inhibits growth of fungal phytopathogens and agglutinates Gram-negative bacteria. *Journal of Experimental Botany*, 59(12), 3475–3484.

- [34] Kirkegaard, J. A., Wong, P. T. W., & Desmarchelier, J. M. (1996). *In vitro* suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. *Plant Pathology*, 45(3), 593–603.
- [35] Smolinska, U., Morra, M. J., Knudsen, G. R., & James, R. L. (2003). Isothiocyanates Produced by Brassicaceae Species as Inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease*, 87(4), 407–412.
- [36] Pereira, P., Nesci, A., & Etcheverry, M. G. (2007). Efficacy of bacterial seed treatments for the control of *Fusarium verticillioides* in maize. *BioControl*, 54(1), 103–111.
- [37] Yates, I. E., Arnold, J. W., Hinton, D. M., Basinger, W., & Walcott, R. R. (2003). *Fusarium verticillioides* induction of maize seed rot and its control. *Canadian Journal of Botany*, 81(5), 422–428.
- [38] Gálvez Patón, Laura; Paris de la Rosa, M; Cordes, G.; Iglesias González, Concepción y Palmero Llamas, Daniel (2012). La podredumbre del cuello del sorgo causada por *Fusarium verticillioides*. *Terralia*, 87, 30-34.
- [39] Xie, S., Jiang, L., Wu, Q., Wan, W., Gan, Y., Zhao, L., & Wen, J. (2022). Maize root exudates recruit *Bacillus amyloliquefaciens* OR2-30 to inhibit *Fusarium graminearum* infection. *Phytopathology*.
- [40] Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- [41] Cui, W., He, P., Munir, S., He, P., Li, X., Li, Y., Wu, J., Wu, Y., Yang, L., He, P., & He, Y. (2019). Efficacy of plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 for biocontrol of southern corn leaf blight. *Biological Control*, 139, 104080.
- [42] Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Asaf, S., Khan, M. A., Kang, S. M., Yun, B. W., & Lee, I. J. (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 236–243.
- [43] Farid, R., Mutale-joan, C., Redouane, B., Mernissi Najib, E., Abderahime, A., Laila, S., & Arroussi Hicham, E. (2018). Effect of Microalgae Polysaccharides on Biochemical and Metabolomics Pathways Related to Plant Defense in *Solanum lycopersicum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188(1), 225–240.
- [44] Stadnik, M. J., & Freitas, M. B. D. (2014). Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology*, 39(2), 111–118.
- [45] Il Kim, P. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1), 177–183.
- [46] Zia, M. A., Riaz, R., Batoool, A., Yasmin, H., Nosheen, A., Naz, R., & Hassan, M. N. (2021). Glucanolytic rhizobacteria associated with wheat- maize cropping system suppress the *Fusarium* wilt of tomato (*Lycopersicon esculentum* L). *Scientia Horticulturae*, 287, 110275.
- [47] Murata, M. M., Ito Morioka, L. R., da Silva Marques, J. B., Bosso, A., & Suguimoto, H. H. (2021). What do patents tell us about microalgae in agriculture? *AMB Express*, 11(1).
- [48] Rachidi, F., Benhima, R., Kasmi, Y., Sbabou, L., & Arroussi, H. E. (2021). Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches. *Scientific Reports*, 11(1).
- [49] Aydi Ben Abdallah, R., Stedel, C., Garagounis, C., Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddine, H., Papadopoulou, K. K., & Daami-Remadi, M. (2017). Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of *Fusarium* wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. *Crop Protection*, 99, 45–58.
- [50] Maung, C. E. H., Gyu Choi, T., Hae Nam, H., & Yong Kim, K. (2017). Role of *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 in the control of *Fusarium* wilt disease and growth promotion of tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 27(12), 1400–1415.