

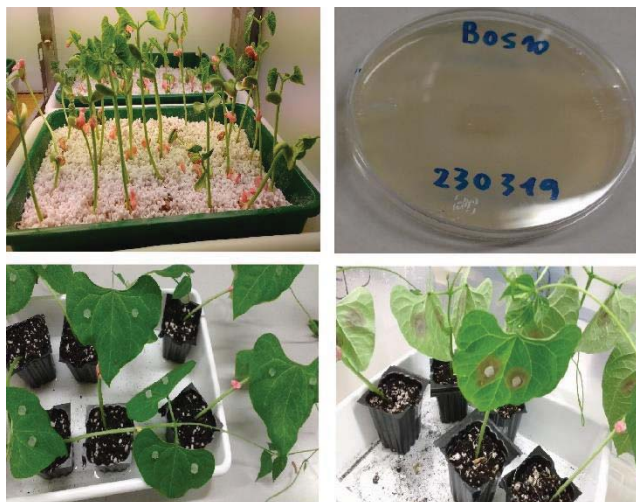
Grao en Bioloxía

## Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Ensaio de resistencia inducida por extractos de *Undaria pinnatifida* e brasinólido en feixón fronte a un fungo patóxico**

**Ensayo de resistencia inducida por extractos de *Undaria pinnatifida* e brasinólido en judía fronte a un hongo patóxico**

**Assay of resistance induced by extracts of *Undaria pinnatifida* and brassinolide in beans against a pathogenic fungus**



Nuria Conde Roca

Xuño 2019

Titores académicos: José Díaz Varela e Javier Veloso Freire



D. JOSÉ DÍAZ VARELA, PROFESOR TITULAR DE FISIOLOXÍA VEXETAL, DOUTOR EN BIOLOXÍA, E D. JAVIER VELOSO FREIRE, CONTRATADO POSDOUTORAL, DOUTOR EN BIOLOXÍA, DO DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA DA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que o presente Traballo de Fin de Grado presentado pola alumna NURIA CONDE ROCA e titulado

“Ensaio de resistencia inducida por extractos de *Undaria pinnatifida* e brasinólido en feixón fronte a un fungo patóxico”

“Ensayo de resistencia inducida por extractos de *Undaria pinnatifida* e brasinólido en judía fronte a un hongo patóxico”

“Assay of resistance induced by extracts of *Undaria pinnatifida* and brassinolide in beans against a pathogenic fungus”

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

E para que así conste, expiden o presente informe en A Coruña, a 19 de Xuño de 2019.

**DIAZ  
VARELA  
JOSE - DNI  
32782379L**

Firmado digitalmente por DIAZ VARELA JOSE - DNI 32782379L  
Nombre de reconocimiento (DN):  
c=ES, o=UNIVERSIDAD DE A CORUÑA, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, ou=BIOLOXIA, ou=1016, serialNumber=IDCES-32782379L, sn=DIAZ VARELA, givenName=JOSE, cn=DIAZ VARELA JOSE - DNI 32782379L  
Fecha: 2019.06.19 13:00:24 +02'00'

**VELOSO  
FREIRE  
JAVIER -  
44836782F**

Digitally signed by VELOSO FREIRE JAVIER - 44836782F  
DN: c=ES, serialNumber=44836782F, sn=VELOSO FREIRE, givenName=JAVIER, cn=VELOSO FREIRE JAVIER - 44836782F  
Date: 2019.06.19 13:15:08 +02'00'



# Índice

<b>1. Resumos</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Obxectivos do traballo</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Introducción</b> .....	<b>6</b>
3.1. Enfermidades das plantas e factores que as causan .....	6
3.2. Defensas e tipos de resistencia das plantas.....	7
3.3. Métodos de control das enfermidades das plantas .....	10
3.4. Feixón ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.), características xerais .....	12
3.5. <i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr, características xerais.....	14
3.6. <i>Undaria pinnatifida</i> (Harvey) Suringar, características xerais .....	14
3.7. Brasinólido, características xerais .....	16
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	<b>18</b>
4.1. Material vexetal.....	18
4.2. Material fúnxico.....	18
4.3. Material hormonal .....	19
4.4. Elaboración do extracto de <i>Undaria pinnatifida</i> .....	19
4.5. Elaboración do extracto do epibrasinólido .....	19
4.6. Ensaio de indución: .....	19
4.6.1. Ensaio con <i>Undaria Pinnatifida</i> .....	19
4.6.2 Ensaio co epibrasinólido .....	21
4.7. Análise estatístico.....	21
<b>5. Resultados</b> .....	<b>22</b>
5.1. A indución co extracto de <i>Undaria Pinnatifida</i> produce un aumento local da infección ás 72 horas postinoculación. ....	22
5.2. A indución co epibrasinólido produce un aumento sistémico da infección ás 72 horas post-inoculación .....	23
<b>6. Discusión</b> .....	<b>25</b>
<b>7. Conclusións</b> .....	<b>29</b>
<b>8. Bibliografía:</b> .....	<b>31</b>



## 1. Resumos

*Phaseolus vulgaris* é unha planta de gran interese, porque se emprega para o consumo en numerosas partes do mundo. Na actualidade vese afectada por diversas enfermidades, unha delas é a causada polo patóxeno necrotrófico *Botrytis cinerea*. Neste traballo comprobamos se a resistencia da planta, *P. vulgaris*, pode ser inducida, tanto a nivel local como a nivel sistémico. Para a estimulación da defensa da planta usamos dous axentes indutores diferentes, extractos da alga *Undaria pinnatifida* e da hormona brasinólido. Os resultados obtidos mostraron que, ningún dos dous axentes indutores son capaces de inducir a resistencia a *Botrytis* en feixón.

### Resumen

*Phaseolus vulgaris* es una planta de gran interés, porque se emplea para consumo en numerosas partes del mundo. Actualmente se ve afectada por diversas enfermedades, una de ellas es la causada por el patógeno necrotrófico *Botrytis cinera*. En este trabajo comprobamos si la resistencia de la planta, *P. vulgaris*, puede ser inducida, tanto a nivel local como a nivel sistémico. Para la estimulación de la defensa de la planta usamos dos agentes inductores diferentes, extractos del alga *Undaria pinnatifida* y la hormona brasinólido. Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los dos agentes inductores son capaces de inducir la resistencia a *Botrytis* en judía.

### Abstract

*Phaseolus vulgaris* is plant of great interest, because it is used for human consumption in many parts of the world. Nowadays, it is affected for different diseases, one of them is caused by a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*. In this work we assayed if the resistance of the plant, *P. vulgaris*, can be induced both at local level and/or at systemic level. For the induction of the plant defense, we used two inducing agents, extracts

of the algae *Undaria pinnatifida*, and the hormone brassinolide. The obtained results show that neither of the two inducing agents were able to induce resistance against Botrytis in bean.

**Palabras clave**

*Phaseolus vulgaris*, *Botrytis cinerea*, *Undaria pinnatifida*, brasinólido, resistencia inducida, resistencia local, resistencia sistémica.



## 2. Obxectivos do traballo

1. Ensañar un extracto da alga *Undaria pinnatifida* como fitofortificante en *Phaseolus vulgaris* L., feixón, contra o fungo necrotrofo *Botrytis cinerea*.
2. Ensañar a hormona vexetal Epibrasinólido como fitofortificante en *Phaseolus vulgaris* L., feixón, contra o fungo necrotrofo *Botrytis cinerea*.

### 3. Introducción

#### 3.1. Enfermidades das plantas e factores que as causan

As plantas enfróntanse a múltiples factores de estrés que poden poñer en risco a súa supervivencia. Por unha banda, falamos de factores abióticos, cando son causas físicas ou químicas, como poden ser a temperatura, a cantidade de auga a que están expostas, a presenza de contaminantes ou sustancias nocivas, e incluso a falta de nutrientes.

Por outra banda, falamos de factores bióticos, cando o dano está causado principalmente por axentes biolóxicos, como poden ser os herbívoros, as bacterias, os fungos patóxenos e os virus.

Neste traballo centrarémonos nos danos que causan os fungos patóxenos, concretamente *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. Os fungos son capaces de introducirse nas plantas mediante dous mecanismos, ben directamente, é dicir, eles mesmos abren unha vía pola que entrar na planta, ou ben indirectamente mediante aberturas naturais da propia planta ou feridas que esta poida ter.

Estes patóxenos diferéncianse en dous grandes grupos atendendo as estratexias que seguen para obter nutrientes da planta hóspede. Por un lado están os patóxenos biotrofos e polo outro están os patóxenos necrotrofos.

Os biotrofos caracterízanse por obter nutrientes dos tecidos vivos da planta (Glazebrook, 2005), é dicir, estes fungos colonizan a planta a través dun haustorio e aproveitan as sustancias nutritivas da mesma, pero sen chegar a matala, polo menos a curto prazo.

Pola contra os fungos necrotrofos atacan a planta e matan as súas células en etapas moi temperás da infección, causando un dano nos tecidos moi extenso. Para causar este dano o fungo é capaz de producir certas fitotoxinas ou sustancias que promoven a morte da célula hóspede (Glazebrook, 2005), un exemplo disto, é *Botrytis cinerea*, que é

capaz de producir un exopolisacárido, que suprime as defensas da planta dependentes de certas hormonas coma os jasmonatos (Pieterse et al., 2011), por tanto o vexetal non é capaz de crear unha resposta efectiva contra este patóxeno. *Botrytis cinerea* é considerado o necrotrofo modelo.

### **3.2. Defensas e tipos de resistencia das plantas**

As plantas son capaces de responder ao ataque de patóxenos mediante diversos tipos de defensa, con todo, seguen un esquema xeral que consistiría primeiramente na percepción do estrés ante o que se atopa. A continuación, a planta procesa o sinal e amplifícao, e por último, xera unha resposta efectiva.

O vexetal é capaz de detectar que lle están causando algún tipo de dano, grazas a que a planta presenta receptores para os chamados elicitores, que son sustancias químicas de diversos tipos, como lípidos, carbohidratos ou péptidos, entre outros, producidos polo patóxeno (Subramanian, Sangha, & Gray, 2011).

Ditas sustancias son recoñecidas porque as plantas presentan receptores de recoñecemento de patróns (PRRs) na superficie das súas células, e estes son capaces de identificar os elicitores, concretamente estes receptores recoñecen ós patróns moleculares asociados a patóxenos (PAMPs), que son os elicitores propios dos patóxenos. Como consecuencia disto indúcese a inmunidade activada por PAMPs, ou PTI (Jones & Dangl, 2006).

Este recoñecemento de patróns moleculares asociados aos patóxenos encóntrase baixo unha gran presión evolutiva. O longo do tempo os patóxenos foron capaces de producir proteínas (efectores) que impiden o recoñecemento dos seus PAMPs polos receptores PRR das plantas impedindo a activación da EPI. Isto produce o que se coñece como a susceptibilidade activada por efector ou ETS.

A ETS favorece a enfermidade e produce un aumento da presenza do patóxeno no medio. Pola súa parte a planta que sofre ETS é capaz de producir novos receptores que recoñecen os efectores do fungo, activándose novamente a defensa da planta. A este novo tipo de inmunidade coñéceselle como inmunidade activada polo efector ou ETI. (Jones & Dangl, 2006)

Tanto a PTI coma a ETI son tipos de resposta local da planta, é dicir, prodúcese no punto de infección, onde o patóxeno se encontra presente. Sen embargo a planta tamén pode desencadear unha resposta sistémica, é dicir, os tecidos nos que non se encontra o patóxeno e que aínda están sans, activan os mecanismos de resistencia para impedir a expansión do patóxeno (Fu & Dong, 2013). Esta última resistencia pode ser de dous tipos: adquirida (SAR) ou inducida (ISR), (Subramanian et al., 2011).

A resistencia sistémica adquirida (SAR), consiste na activación de defensas (produción de proteínas PR) en tecidos sans trala percepción da presenza do patóxeno noutras partes da planta (Strange, 2003). Foi a primeira en ser descuberta e os primeiros usos na práctica empregaban cepas do patóxeno atenuados pouco virulentos para inmunizar a planta fronte as cepas do patóxeno máis virulentas.

A SAR está mediada pola hormona vexetal ácido salicílico (SA) (Figura 1). Esta hormona prodúcese a nivel local onde se percibe o patóxeno, a cal activa unha serie de proteínas reguladoras, como NPR1, que se encargan de transmitir o sinal os tecidos sistémicos e de producir nestes a activación dos xenes de defensa. Serán estes xenes os que codifiquen proteínas relacionadas ca patoxénese (PR) como son as quitinasas ou as glucanasas que en última instancia son as que atacarán ao patóxeno (Pieterse et al., 2009).

A SAR é unha resposta producida pola planta ante infeccións causadas por patóxenos biotrofos, como son os virus ou oidios (Glazebrook, 2005).

Por outra banda a ISR, tamén xera unha resposta sistémica, ao igual que a SAR, pero non depende da percepción dun patóxeno atenuado se non de organismos beneficiosos. Observouse que plantas nas que se daba unha asociación nas súas raíces de rizobacterias promotoras do crecemento (PGPR) eran máis resistentes a enfermidades. Estas bacterias desencadeaban na planta unha resposta sistémica que activaba as súas defensas.

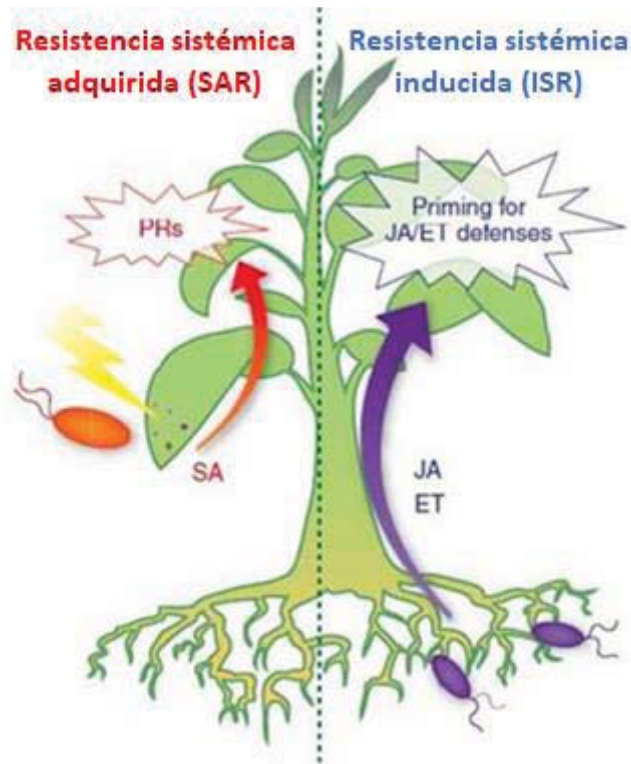
A diferenza da SAR, na que a percepción do patóxeno atenuado producía unha activación directa das defensas, na ISR a activación dáse en dúas fases. Na primeira fase dáse a percepción das rizobacterias beneficiosas e a activación do estado de priming. Este estado de priming é un estado no que a planta é capaz de activar as defensas máis rápido e eficazmente.

A segunda fase prodúcese só se a planta entra en contacto co patóxeno. Nesta segunda fase é na que os xenes de defensa, que producen as proteínas PR actívanse e fano de maneira máis rápida e intensa grazas o estado de priming. A ISR depende das hormonas ácido jasmónico (JA) e etileno (ET), (figura 1) (Strange, 2003).

O primeiro paso da resposta é a síntese das hormonas ET e JA. A forma activa da hormona JA é o conxugado co aminoácido isoleucina, formando o conxunto JA-ile. A percepción do JA-ile produce a degradación dun grupo de represores coñecidos como JAZ (“Jasmonate Zim”), que actúan como reguladores negativos da transcripción de xenes de resposta a JA. O ET é percibido por uns receptores de membrana da familia ETR que, trala súa activación polo ET, activan os xenes de resposta ó ET. O JA e o ET actúan de forma sinérxica nos procesos de defensa aínda que noutros procesos son antagónicos. (Pieterse et al., 2009).

Cómpre sinalar, que a ISR é unha resposta producida pola planta ante infeccións causadas por patóxenos necrotrofos, (Glazebrook, 2005),

como por exemplo o do caso que estudiamos neste traballo, o fungo *Botrytis cinerea*.



**Figura 1:** principais tipos de resistencia sistémica, SAR e ISR, e as súas características máis importantes. SA: ácido salicílico, JA: ácido jasmónico, ET: etileno. Obtido de <https://doi.org/10.1038/nchembio> (Pieterse et al., 2009)

Estes mecanismos de defensa están a ser explotados de maneira comercial como é o caso do uso de patóxenos atenuados, ou completamente avirulentos, ou o uso de bacterias beneficiosas. Estas prácticas danse sobre todo en especies de interese económico, como son os cultivos de alto rendemento, entre os que se atopa o feixón. Estas prácticas intégranse nos métodos convencionais para o control das enfermidades, como é o uso de pesticidas. Isto permite a redución destas prácticas clásicas altamente contaminantes.

### 3.3. Métodos de control das enfermidades das plantas

Para o control das enfermidades das plantas en agricultura úsase unha técnica coñecida como manexo integrado de pragas (IPM), o cal

consiste en combinar métodos antigos con novos métodos de protección ante pragas. Este método integra medidas que acaben coas pragas pero que reduzan os riscos para o ser humano e o medio ambiente, facendo que os cultivos sexan saudables e causen un menor impacto (Food and Agriculture Organization of the United Nations, n.d.). En definitiva, con esta técnica preténdese que o control das enfermidades sexa o máis amigable co ambiente posible.

Unha medida de acordo co manexo integrado de pragas é o emprego de fitofortificantes, que son sustancias ou microorganismos cuxa función é protexer as plantas contra organismos nocivos (AEFISA), activando os propios mecanismos da planta (SAR e ISR), por tanto, estas sustancias non teñen un efecto directo sobre o patóxeno xa que non son tóxicos. Neste traballo estudarase a capacidade fitofortificante de dous indutores.

Os métodos integrados contemplan o uso de pesticidas clásicos, sustancias químicas que si afectan directamente aos patóxenos, intentando erradicalos e así protexendo a planta. Os métodos integrados intentan reducir o uso destas sustancias xa que teñen un maior impacto no medio, sobre todo se o uso non é o axeitado en canto a concentración e aplicación. Os métodos integrados reducen o uso de pesticidas clásicos complementándoos con fitofortificantes ou con outros métodos.

Os programas de mellora xenética, son un dos métodos usados no control integrado. Consisten na obtención dun xenotipo de planta máis resistente ás pragas, mediante o cruzamento de varios individuos ata obter o xenotipo resistente.

De igual maneira tamén, é un factor importante as condicións ambientais nas que se atope o cultivo, é dicir, a temperatura, a cantidade de auga ou a cantidade de nutrientes dos que dispoñen as plantas, son factores que poden favorecer a aparición de pragas. Por este motivo outros métodos de control a ter en conta serían a rotación de cultivos ou o uso de policultivos, que non é máis que empregar un mesmo terreo para o cultivo de varias especies diferentes.

Tanto a medida de rotación como a inclusión de policultivos son beneficiosos para evitar a propagación das poboacións de patóxenos, xa que desta maneira estaríase a interromper a localización do hóspede e, tamén, a aumentar a distancia entre os cultivos do mesmo tipo, o que faría máis difícil a dispersión da infección (Rusch. et al., 2013).

Todos estes métodos teñen en común que buscan reducir perdas no sector agrario, pois empréganse principalmente en cultivos comerciais, como por exemplo no feixón (*Phaseolus vulgaris* L.), que é a especie que nos ocupa neste traballo.

### 3.4. Feixón (*Phaseolus vulgaris* L.), características xerais

Para a realización do experimento usaremos a *Phaseolus vulgaris* L. como hóspede, o cal se pode clasificar taxonomicamente como mostramos a continuación na táboa 1.

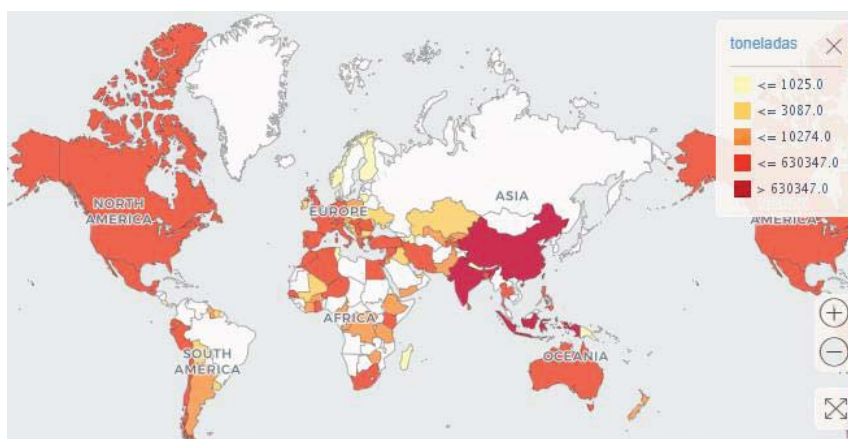
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orde</b>	Fabales
<b>Familia</b>	Fabaceae
<b>Xénero</b>	Phaseolus

**Táboa 1:** clasificación taxonómica de *Phaseolus vulgaris* L.

Hai diversas variedades de feixóns, con diferencias en altura, cor e forma. Podemos ter dende variedades ananas duns 40 cm, ata variedades erguidas con ata 2-3 m, de cores brancas, negras ou vermellas, que ao fin son o resultado da evolución da planta silvestre. (Rodrigo, 2000).

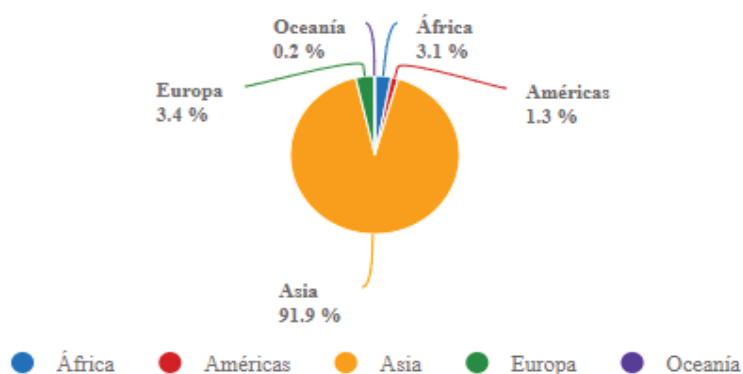
Os feixóns son plantas moi empregadas en agricultura, xa que a súa semente é usada para consumo, por isto na actualidade podémola atopar en case todos os lugares do mundo, aínda que é orixinaria de Centro-América (Figura 2) (FAOSTAT, 2017).





**Figura 2:** distribución mundial do cultivo de feixón. Obtido de <http://www.fao.org/faostat/es> (FAOSTAT 2017)

En España xéranse arredor de 163.649 toneladas de feixóns ao ano, en Europa esta cantidade multiplícase por 5. A pesar destes valores Europa atópase entre as rexións con menor produción (3,4%), sendo, pola contra, Asia a maior produtora de feixóns, (91,9%) (Figura 3)



**Figura 3:** produción de feixóns por rexión. Obtido de <http://www.fao.org/faostat/es> (FAOSTAT 2017)

A grande problemática a que se enfrenta este tipo de cultivo son as enfermidades as que están expostos. Unha delas é a infección causada polo fungo patóxeno *Botrytis cinerea Pers.:Fr.*

### 3.5. *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, características xerais

*Botrytis cinerea* Pers.:Fr é un ascomicete pertencente a familia dos Sclerotinicaeae (táboa 2), caracterízase por presentar un gran número de posibles hóspedes, o que o fai moi importante para a economía mundial, posto que infecta a moitas plantas empregadas para a agricultura.

<b>Reino</b>	Fungi
<b>División</b>	Ascomycota
<b>Clase</b>	Leotiomycetes
<b>Orde</b>	Helotiales
<b>Familia</b>	Sclerotinicaeae
<b>Xénero</b>	Botrytis

**Táboa 2:** Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.

Este fungo é un necrotrofo, que, como se veu anteriormente, caracterízase por un modo de infección consistente en matar as células da planta e logo infectar os tecidos mortos, para finalmente obter os nutrientes das células xa mortas (Fu & Dong, 2013).

Botrytis é un patóxeno de espectro amplío, é dicir, infecta a un gran número de hóspedes diferentes, polo que se considera un fungo cun impacto extenso para a agricultura, en xeral. A perda económica causada por Botrytis supera os 10 mil millóns anuais (Hua et al., 2018)

Para combater a enfermidade causada por este fungo en feixón, no presente traballo empregamos extractos da alga *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, e un brasinólido, como indutores da resistencia.

### 3.6. *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, características xerais

A alga *Undaria pinnatifida*, tamén coñecida como wakame presenta a seguinte clasificación taxonómica (táboa 3):

<b>Reino</b>	Protoctista
<b>División</b>	Heterokontophyta
<b>Clase</b>	Phaeophyceae
<b>Orde</b>	Laminariales
<b>Familia</b>	Alariaceae
<b>Xénero</b>	Undaria

**Táboa 3:** clasificación taxonómica de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar

Esta alga é propia de Xapón, Corea e China, máis na actualidade presenta unha distribución máis ampla, converténdose nunha especie invasora en Gran Bretaña, Francia, México, Australia, Nova Zelandia e nalgunhas zonas de España, como Asturias e Galicia (A Coruña e Rias Baixas) (Figura 4) (GBIF).



**Figura 4:** distribución mundial de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. Obtido de <https://www.gbif.org/es> (GBIF)

O wakame, caracterízase por vivir no infralitoral e medra sobre pedras ou estruturas artificiais, aos cales se adhire por medio de rizoides ramificados. Presenta unha gran talla, de ata 2 metros de lonxitude, ademais ten unha lamina bastante grande e plana, con un nervio central e lóbulos nos laterais.

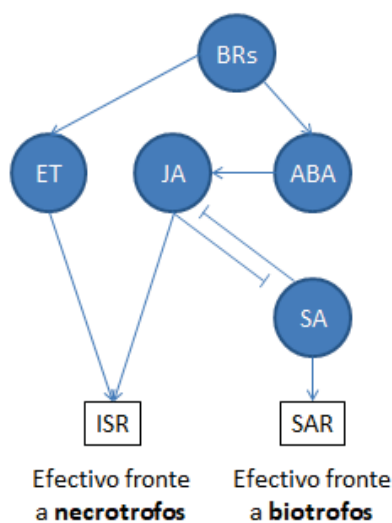
Do mesmo xeito, empregaremos un brasinólido para comprobar se é capaz de inducir a resistencia da planta.

### 3.7. Brasinólido, características xerais

Os brasinólidos illáronse, por primeira vez na década dos setenta, a partir do pole de *Brassica napus* L., (Hernández & Martínez, 2016) e son hormonas pertencentes ao grupo dos brasinoesteroides, que se poden formar ben a partir do campesterol ou ben a partir da ruta dos esteroides.

Os brasinoesteroides (BRs) teñen un papel moi importante nalgúns procesos biolóxicos das plantas, como a xerminación de sementes, a división celular, regulación do metabolismo ou a resposta ante o estrés dos vexetais, entre outros (Tang et al., 2016). Cómpre sinalar que dentro deste grupo, os brasinólidos son os que producen unha maior actividade biolóxica (Hernández & Martínez, 2016).

En concreto na defensa da planta, os brasinoesteroides interveñen na composición e estrutura da parede celular vexetal, favorecendo a deposición de celulosa, e mantendo estable a disposición da mesma, o que fai que o fungo teña maiores dificultades para atacar a planta, (Abouraïcha et al., 2015). Do mesmo xeito, provocan unha cascada de sinalización que activa a defensa da planta, (Shin et al., 2016), ademais, interactúan con outras hormonas (Figura 5).



**Figura 5:** interacción entre as diferentes rutas de sinalización hormonal durante a activación da respostas sistémica. BRs: brasinoesteroides. ET: etileno. JA: jasmonato. ABA: ácido abscísico. SA: ácido salicílico. ISR: resistencia sistémica inducida. SAR: resistencia sistémica adquirida. Adaptado de Gallego, 2015.

Os brasinoesteroides inducen a ruta de sinalización do ET/JA facilitando a activación da ISR. Pola contra, os brasinoesteroides inhiben a SAR, e polo tanto reducen as defensas fronte a patóxenos biotrofos.

Neste caso empregaremos o epibrasinólido para inducir a resistencia en feixón ao patóxeno necrotrofo *Botytis cinerea*. O epibrasinólido usado neste traballo foi obtido da empresa Sigma-Aldrich, o cal presenta unha estrutura con 28 átomos de carbono.

## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Material vexetal

Para a realización do traballo empregamos sementes de feixón (*Phaseolus vulgaris*), as cales se sementaron en perlita humedecida coa solución nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), a concentración 1:5. A continuación, puxéronse a xerminar nunha cámara, durante sete días, nos cales se procedeu a regar con solución nutritiva segundo fose necesario. Transcorrido ese período realizouse o transplante das plántulas a pocillos de plástico, nun substrato formado por terra e perlita en proporción 3:1. Seguidamente depositáronse as plantas, de novo, na cámara durante catro días.

Do mesmo xeito, para o experimento empregamos a alga wakame, (*Undaria pinnatifida*), usada para a preparación do extracto, e a cal se obtivo comercialmente da empresa Portomuiños, quen a distribúe en forma deshidratada.

### 4.2. Material fúnxico

Como patóxeno usouse o illado B0510 de *Botitrys cinerea*, o cal se cultivou e repicou no medio PDA (Pataca Dextrosa Agar). O stock orixinal de B0510 almacenase nunha suspensión de conidios en glicerol 10% a -80°C. Para o seu uso, puxéronse 2 µl do stock de glicerol en medio PDA e deixouse medrar durante unha semana. Estas placas repicáronse a novo medio PDA e deixáronse medrar durante 3 días. As placas de 3 días foron usadas como fonte do inculo.

### **4.3. Material hormonal**

Para a indución da resistencia empregouse un brasinoesteroide, o epibrasinólido, con referencia E1641 e comercializado pola empresa Sigma-Aldrich.

### **4.4. Elaboración do extracto de *Undaria pinnatifida***

Para a preparación do extracto primeiro homoxeneizamos en seco 0,3 g de *Undaria pinnatifida*, seguidamente engadimos 10 ml de metanol ao 80%. Dispónse o homoxeneizado nun tubo e incúbase o mesmo a 65 °C durante 15 minutos.

A continuación, axitamos o tubo e procedemos a filtrar a mestura coa axuda de papel de laboratorio. Unha vez filtrado, nivelamos con metanol ao 80% ata obter 10 ml de volume final, volvemos axitar por inversión, e reservamos o extracto para o ensaio de resistencia inducida.

### **4.5. Elaboración do extracto do epibrasinólido**

Para a preparación do extracto partimos dun stock de epibrasinólido diluído en DMSO (dimetilsulfoxido) cunha concentración de 20 mM. Collemos 70 µl do mesmo e engadímolo a 70 ml de auga destilada. A continuación axitamos a mestura, e reservámola para o experimento.

### **4.6. Ensaio de indución:**

#### **4.6.1. Ensaio con *Undaria Pinnatifida***

Transcorridos 4 días dende o transplante das plántulas, procedemos a realización da indución. Para isto collemos dous grupos con seis individuos cada un. Un dos grupos será o que empreguemos como control e o outro será o grupo inducido.

Por unha banda, en cada planta control seleccionamos unha folla que pulverizamos con 10 ml dunha solución 1:1000 (unha parte de metanol ao 80% en 1000 partes de auga destilada). A outra folla da plántula non foi pulverizada co fin de obter resultados tanto para a resistencia local (folla pulverizada) como para a resistencia sistémica (folla non-pulverizada).

Por outra banda, en cada planta inducida, escollemos unha folla e pulverizámola, seguindo o mesmo procedemento ca co grupo control pero empregando 10 ml dunha solución cunha dilución 1:1000 do extracto da alga (1 parte do extracto de alga en alcohol 80% preparado anteriormente en 1000 partes de auga destilada).

Pasadas 24 horas da indución, procedemos a inocular as plántulas, para iso empregamos o fungo *B. cinerea*, repicado en días anteriores nas placas de PDA. Coa axuda dun sacabocados, obtemos discos de micelio do fungo de 7 mm de diámetro. En cada plántula póñense dous discos por folla, tanto na pulverizada, como na que non se pulverizou, en total catro discos por planta (figura 6). A continuación, introdúcense as plántulas nunha caixa con suficiente humidade e déixanse na cámara, con incidencia da luz lateralmente, para observar os síntomas da infección posteriormente, e comprobándoos mediante a toma de medidas de diámetro de cada infección.



**Figura 6:** planta de feixón na que se amosa o deseño do ensaio. Na folla local (pulverizada co indutor) presenta dous discos de micelio nos que xa se observa expansión da infección (planta 72 horas trala inoculación). A folla sistémica (á esquerda da imaxe) non foi pulverizada co indutor e foi inoculada de maneira similar con outros dous discos de micelio.



Repetimos este proceso ao día seguinte, xa que realizamos un experimento en tándem, obtendo así datos de 24 plántulas en total (12 control e 12 tratamento).

#### **4.6.2 Ensaio co epibrasinólido**

O procedemento do ensaio co epibrasinólido é o mesmo que o empregado con *Undaria pinnatifida*, a única diferenza foi que en lugar do extracto da alga, para o tratamento empregamos o extracto obtido do brasinólido.

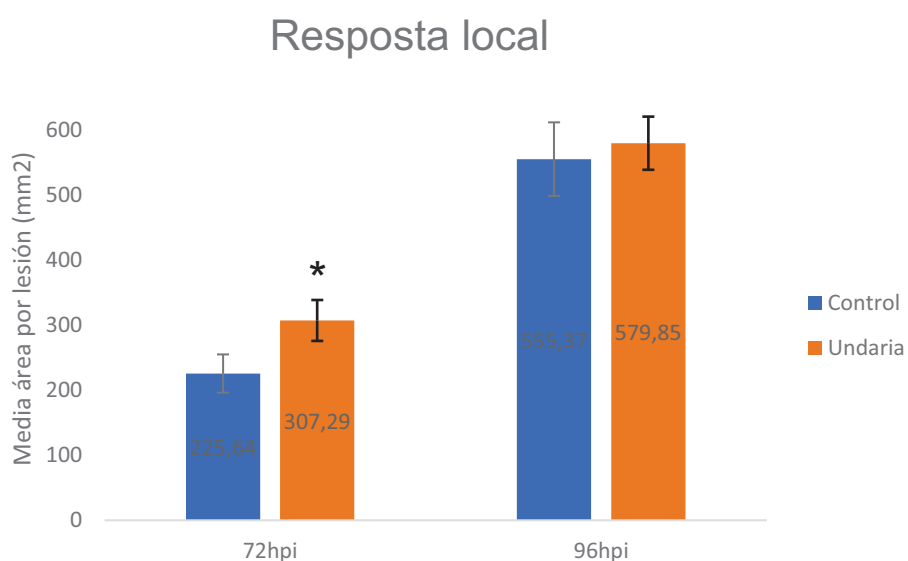
#### **4.7. Análise estatístico**

Para o estudo estatístico dos datos utilizouse o programa R, usando o entorno R-studio. Realizamos a análise ANOVA cun post-hoc de Tukey e un  $\alpha$  de 0,1, para comparar os datos do experimento control e o experimento tratamento, tanto para o caso de *Undaria* como para o caso do epibrasinólido.

## 5. Resultados

### 5.1. A indución co extracto de *Undaria Pinnatifida* produce un aumento local da infección ás 72 horas postinoculación.

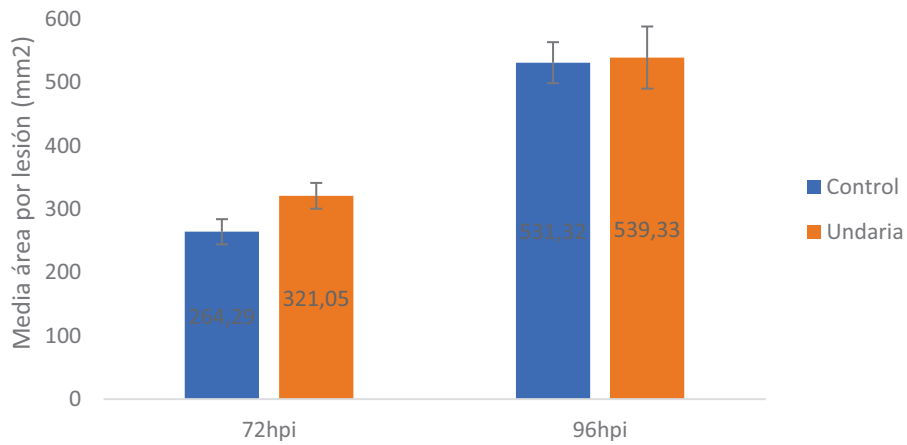
Para comprobar a indución da resposta defensiva da planta, obtivéronse datos da lesión en expansión as 72 e 96 horas post-inoculación, diferenciando entre a resposta local e sistémica da planta, como se pode ver nas Figura 7 e na Figura 8 respectivamente.



**Figura 7:** área de expansión do fungo a 72 e 96 horas post-inoculación, en plantas control e plantas tratadas con *Undaria pinnatifida* a nivel local

Como podemos ver no gráfico anterior a lesión causada polo fungo en plantas tratadas é superior a lesión que causa en plantas control. Obsérvanse diferenzas significativas ás 72 horas post-inoculación, entre o tratamento e o control, pero non son os resultados esperados, xa que a lesión nas plantas tratadas é superior. Estes resultados indícanos que o tratamento co extracto da alga non reduciu a infección se non que a aumentou a nivel local.

## Resposta sistémica



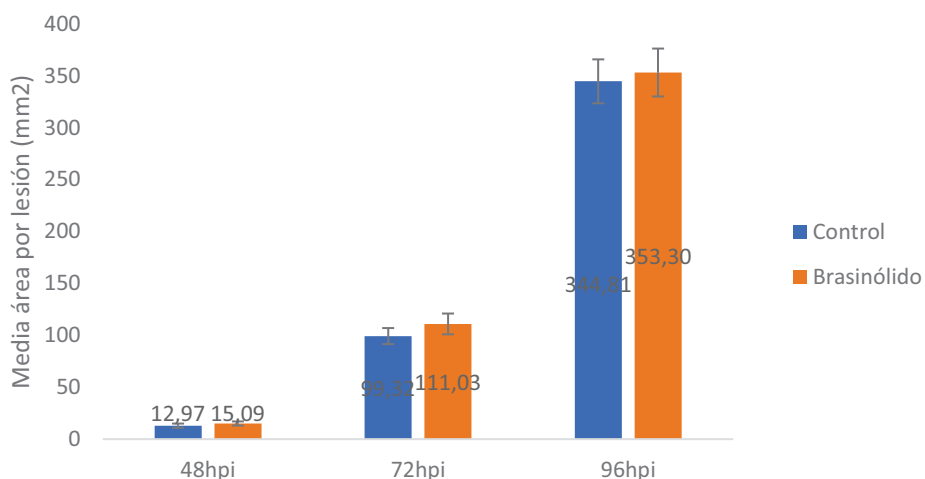
**Figura 8:** área de expansión do fungo a 72 e 96 horas post-inoculación, en plantas control e plantas tratadas con *Undaria pinnatifida* a nivel sistémico.

No caso da resposta sistémica do vexetal non vemos diferenzas significativas entre as plantas control e as tratadas co extracto da alga.

### 5.2. A indución co epibrasinólido produce un aumento sistémico da infección ás 72 horas post-inoculación

No caso da indución da resposta defensiva tratando a planta co epibrasinólido, obtivemos datos da lesión en expansión a 48, 72 e 96 horas post-inoculación, facendo diferenzas, ao igual ca no caso anterior entre a resposta local, Figura 9, e a resposta sistémica, Figura 10.

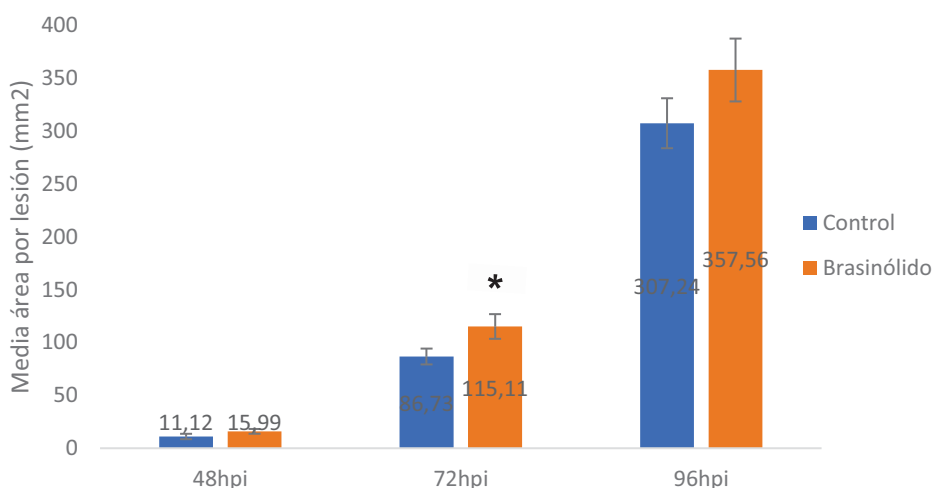
## Resposta Local



**Figura 9:** área de expansión do fungo a 48, 72 e 96 horas post-inoculación en plantas control e plantas tratadas co brasinólido a nivel local.

Como vemos na Figura 9, as lesións das plantas tratadas co brasinólido non amosaron diferenzas significativas a nivel local en ningún dos tempos medidos.

## Resposta sistémica



**Figura 10:** área de expansión do fungo a 48, 72 e 96 horas post-inoculación, en plantas control e plantas tratadas co brasinólido a nivel sistémico.

Na resposta sistémica da planta, podemos ver os resultados na Figura 10, observase un aumento da infección debida o tratamento co brasinólido. Como se observa, a lesión causada nas plantas tratadas é significativamente maior ca no control ás 72 horas post-inoculación.

## 6. Discusión

As algas conteñen diversos compostos que poden favorecer a outras especies vexetais, ben servindo como fertilizantes, mellorando así, a produtividade de cultivos, ou usándoas como bioestimulantes contra estrés biótico ou abiótico (Sharma et al., 2014).

*Undaria pinnatifida* é unha das algas empregadas como bioestimulante en diversos estudos. De Corato et al. (2017), levaron a cabo un experimento para comprobar a composición de extractos de dita alga, e para ver a súa eficacia. Obtiveron que a alga crúa, presentaba un 42% de lípidos, un 22% de polisacáridos solubles en auga e un 0,4% de compostos fenólicos, todos eles produtos que poden intervir na defensa da planta.

No noso caso observamos que o tratamento con *Undaria pinnatifida* non dou resultados de inhibición do fungo, senón todo o contrario xa que a área de infección é maior nos individuos tratados ca nos individuos control.

Pola contra, hai diversos traballos que si obteñen un resultado positivo ao empregar *Undaria* como antifúnxico, como é o caso de De Corato et al. (2017), o cal di que os extractos de *U. pinnatifida* teñen un efecto inhibitorio contra *Botrytis*, en ensaios realizados en froita, xa que a alga foi capaz de reducir a infección. Neste caso empregaron, fresas, melocotóns e limóns.

Do mesmo xeito, Leal (2017) acadou resultados positivos contra *Botrytis cinerea* ao aplicar *U. pinnatifida*. Con todo, nese caso, empregouse pemento como especie de estudo, en lugar de feixón, o que pode explicar as diferenzas obtidas.

De igual maneira, hai estudos que empregan feixón, pero cambian o indutor, nos que tamén obtiveron resultados significativos na resistencia ante *Botrytis cinerea*, como é o caso de Coteló (2016). Neste estudo empregaron a hormona bencilaminopurina, unha citoquinina, como indutor.

Xeralmente, as citoquininas asóciase coa resposta da planta ante biotrofos (Pieterse et al., 2011), posto que interveñen na sinalización do ácido salicílico. Pero neste caso, Cotelo (2016), as citoquininas foron capaces de inducir a resistencia ante un patóxeno necrotrofo, ao igual que noutros estudos como o de Rey, (2016).

Cabe salientar o efecto potenciador da infección, xa que o aplicar o extracto Undaria observáronse lesión significativamente maiores. Este efecto a nivel local pode ser debido a sustancias contidas no extracto que entran en contacto directo co fungo *Botrytis*. É posible que o extracto conteña sustancias, como azucres, que o fungo use como nutrientes. Cabe salientar que o extracto esta moi diluído, polo que a dispoñibilidade destes nutrientes non debería ser moi elevada.

No que se refire ao experimento co epibrasinólido, tampouco obtivemos resultados favorables, senón que nos sucede algo similar ca con *U. pinnatifida*, a área de lesión é maior nos individuos tratados ca nos individuos control. Pola contra, neste caso atopamos diferencias máis significativas entre o control e o tratamento, na resposta sistémica da planta, cando antes os resultados máis significativos obtivéronse en resistencia local. Polo tanto, ó contrario ca caso anterior, o efecto do brasinólido non e directo sobre o fungo.

En contraposición, hai diversos estudos nos que os resultados, ao empregar brasinoesteroides como indutores, foron positivos, é dicir, estas hormonas foron capaces de inducir a resistencia das plantas.

Un exemplo é o traballo de Nakashita et al. (2003), no cal empregaron arroz e tabaco, para comprobar a súa resistencia fronte a diferentes enfermidades. Cómpre sinalar que tanto as plantas empregadas como os axentes causantes de enfermidade non foron os mesmos cos usados neste traballo. Nakashita et al. (2003) usaron os patóxenos virus do mosaico do tabaco (TMV), *Oidium sp.* e *Pseudomonas syringae*.

Estes tres patóxenos, pertencen ao grupo dos biotrofos, o que apoiaría que os nosos datos non fosen positivos, xa que empregamos un patóxeno necrotrofo. Por tanto, a planta estaríase defendendo contra un

patóxeno que non a está atacando, provocando que a defensa fronte ao necrotrofo non fose efectiva, e máis, ao activar unha resposta antagónica inhibise a resposta contraria.

Bjornson et al. (2016), tamén concluíron que ao aplicar brasinólidos disminuía o dano causado por *Botrytis cinerea*, pero no seu caso o estudio foi realizado en arabidopsis. Por ilo, é importante coñecer o efecto que ten o brasinólido na planta que se queira protexer, xa que a mesma sustancia produce respostas diferentes dependendo da especie.

Do mesmo xeito, Peres et al. (2019) expoñen que en arabidopsis, os brasinoesteroides poden regular os niveis de etileno, e como vimos está hormona intervén na defensa da planta contra necrotrofos. Afirmar que niveis baixos de BRs inhiben a síntese de etileno, mentres que niveis altos de BRs promoven a síntese do mesmo.

Isto podería explicar tamén os nosos resultados, posto que se a cantidade de brasinoesteroides non foi suficiente cabe a posibilidade de que os niveis de etileno tampouco o fosen, levando á inhibición da resposta da planta.

Por outra banda, Campos et al (2009), estableceron unha relación antagónica entre as hormonas jasmonatos e brasinoesteroides. Afirmando que na planta, que eles usaron, tomate, os brasinoesteroides non inducían a resposta senón que a inhibían, en contraposición ao que sucede con arabidopsis.

Estableceron que a planta presentaba un “dilema de asignación de recursos”, é dicir, por un lado a síntese de JA inducía o destino de recursos a defensa da planta, e por outro lado a síntese de BRs inducía ao crecemento da mesma.

Os resultados obtidos por Campos et al. (2009) apoian os nosos resultados, xa que se as plantas tratadas co brasinoesteroide estivesen dedicando a maioría de recursos o crecemento, a defensa da planta fronte a *B. cinerea* veríase minguada.

Bajguz e Hayat (2009), expuxeron que os brasinoesteroides son responsables da estimulación da síntese de proteínas relacionadas coa patoxénese ao aumentar o nivel de ácido salicílico.

Ao incrementar o nivel de SA, a resposta que produce a planta é a SAR, que como xa se dixo, intervén ante patóxenos biotrofos. Polo que chegamos a mesma conclusión ca co estudo realizado por Nakashita et al. (2003). Como *Botrytis* é un fungo necrotrofo, a resposta dada pola planta, sería ineficiente, posto que se estaría a defender contra patóxenos que non presenta, evitando así unha resposta ante *Botrytis* efectiva.

Ademais, conclúen que dependendo do modo e do tempo de aplicación dos brasinoesteroides, o resultado pode ser a protección ou a non-protección ante o patóxeno.

Debemos ter en conta que nos estudos citados anteriormente ((Campos et al., 2009); (Peres et al., 2019)) e tamén noutros traballos como o de Huot et al. (2014), os autores insisten na necesidade da realización de máis estudos para establecer claramente o papel regulador entre os brasinoesteroides e as outras hormonas das plantas, así como a interacción cos patóxenos.



## 7. Conclusións

- A aplicación esóxena do extracto de *Undaria pinnatifida* induciu nas follas de *P. vulgaris* susceptibilidade fronte o fungo *Botrytis cinerea* a nivel local. Polo tanto, o extracto de *Undaria pinnatifida* a concentración usada e co método de aplicación empregado non é efectivo para a protección de *P. vulgaris* fronte a *Botrytis cinerea*.
- A aplicación esóxena do brasinólido tamén induciu nas follas de *P. vulgaris* susceptibilidade fronte o fungo *Botrytis cinerea* pero neste caso a nivel sistémico. Polo tanto, o brasinólido a concentración usada e co método de aplicación empregado non é efectivo para a protección de *P. vulgaris* fronte a *Botrytis cinerea*.

### Conclusiones

- La aplicación exógena del extracto de *Undaria pinnatifida* indujo susceptibilidad en las hojas de *P. vulgaris* frente al hongo *Botrytis cinerea* a nivel local. Por lo tanto, el extracto de *Undaria pinnatifida* a la concentración usada y con el método de aplicación empleado no es efectivo para la protección de *P. vulgaris* frente a *Botrytis cinerea*.
- La aplicación exógena del brasinólido también indujo susceptibilidad en las hojas de *P. vulgaris* frente al hongo *Botrytis cinerea* pero en este caso a nivel sistémico. Por lo tanto, el brasinólido a la concentración usada y con el método de aplicación empleado no es efectivo para la protección de *P. vulgaris* frente a *Botrytis cinerea*.

### Conclusions

- The exogenous application of the *Undaria pinnatifida* extract induced susceptibility in *P. vulgaris* against the fungus *Botrytis*

cinerea at local level. Therefore, the *Undaria pinnatifida* extract, at the concentration used and with the employed application method, is not effective protecting *P. vulgaris* against *Botrytis cinerea*.

- The exogenous application of the brassinolide also induced susceptibility in *P. vulgaris* against the fungus *Botrytis cinerea* but in this case at systemic level. Therefore, the brassinolide, at the concentration used and with the employed application method, is not effective protecting *P. vulgaris* against *Botrytis cinerea*.

## 8. Bibliografía:

- Abouraïcha, E., El Alaoui-Talibi, Z., El Boutachfai, R., Petit, E., Courtois, B., Courtois, J., & El Modafar, C. (2015). Induction of natural defense and protection against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae. *Scientia Horticulturae*, *181*, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.002>
- AEFISA (Asociación Española de Fitosanitarios y Sanidad Ambiental). (n.d.). Fitosanitarios. Retrieved April 19, 2019, from <http://www.aefisa.es/productos/fitosanitarios>
- Bajguz, A., & Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, *47*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002>
- Bjornson, M., Dandekar, A. M., Chory, J., & Dehesh, K. (2016). Brassinosteroid's multi-modular interaction with the general stress network customizes stimulus-specific responses in *Arabidopsis*. *Plant Science*, *250*, 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.007>
- Campos, M. L., De Almeida, M., Rossi, M. L., Martinelli, A. P., Litholdo Junior, C. G., Figueira, A., ... Pereira Peres, L. E. (2009). Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. *Journal of Experimental Botany*, *60*(15), 4347–4361. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp270>
- Casal, C. R. (2016). Ensayo del etileno y de una citoquinina como posibles fitosanitarios frente a *Botrytis cinerea* en la planta ornamental *Zinnia elegans* Ensaio do etileno e dunha citocinina como posibles fitosanitarios fronte a *Botrytis* ornamental *Zinnia elegans* Trabajo Fin. *Universidade Da Coruña*.
- Cotelo Morales, M. (2016). *propiedades de la bencilaminopurina para el control de Botrytis cinerea en judía: actividad fungicida e inducción de resistencia*.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (n.d.). FAOSTAT. Retrieved April 19, 2019, from <http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (n.d.). Plant Production and Protection Division: Integrated Pest Management. Retrieved May 21, 2019, from <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/ipm/en/>
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). *Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense*. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
- GBIF. (n.d.). *Undaria pinnatifida* (Harv.) Suringar. Retrieved April 19, 2019, from <https://www.gbif.org/es/species/5422556>
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *43*(1),

205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>

- Hernández, E., & Martínez, I. (2016). Brasinoesteroides en la agricultura . I. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(2), 441–450.
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111–119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- Jones, J. D. G & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 3–9.
- Paula, A., & Míguez, R. (2000). *Caracterización morfoagronómica y bioquímica de germoplasma de judía común ( Phaseolus vulgaris L .) de España Director: Caracterización morfoagronómica y bioquímica de germoplasma de judía común ( Phaseolus*.
- Peres, A. L. G. L., Soares, J. S., Tavares, R. G., Righetto, G., Zullo, M. A. T., Mandava, N. B., & Menossi, M. (2019). Brassinosteroids, the sixth class of phytohormones: A molecular view from the discovery to hormonal interactions in plant development and stress adaptation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020331>
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2011). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Rusch, A., Bommarco, R., Jonsson, M., Smith, H. G., & Ekbom, B. (2013). Flow and stability of natural pest control services depend on complexity and crop rotation at the landscape scale. *Journal of Applied Ecology*, 50(2), 345–354. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12055>
- Sharma, H. S. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., & Martin, T. (2014). *Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses*. 465–490. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0101-9>
- Shin, S. Y., Chung, H., Kim, S. Y., & Nam, K. H. (2016). BRI1-EMS-suppressor 1 gain-of-function mutant shows higher susceptibility to necrotrophic fungal infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470(4), 864–869. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.128>
- Strange, R. N. (2003). *Introduction to plant pathology* (University College London, Ed.). London: Wiley.
- Subramanian, S., Sangha, J. S., & Gray, B. A. (2011). *Extracts of the marine brown macroalga , Ascophyllum nodosum , induce jasmonic acid dependent systemic resistance in Arabidopsis thaliana against Pseudomonas syringae pv . tomato DC3000 and Sclerotinia sclerotiorum*. 237–248. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9802-6>

Tang, J., Han, Z., & Chai, J. (2016). Q&A: What are brassinosteroids and how do they act in plants. *BMC Biology*, 14(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0340-8>