



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

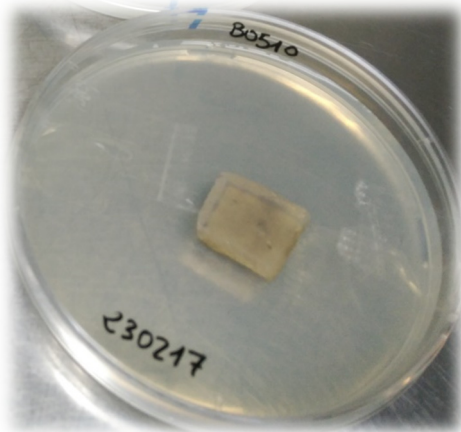
Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Propiedades de extractos de algas para o control de
Botrytis cinerea en pemento

Propiedades de extractos de algas para el control de
Botrytis cinerea en pimiento

Properties of seaweed extracts to control *Botrytis
cinerea* in pepper



Noa Leal Paz

Xuño 2017

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 NOA LEAL PAZ e titulado

“Propiedades de extractos de algas para o control de *Botrytis cinerea* en pemento”

“Propiedades de extractos de algas para el control de *Botrytis cinerea* en pimiento”

“Properties of seaweed extracts to control *Botrytis cinerea* in pepper”

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 e asinan o presente informe en A Coruña, a 19 de Xuño de 2017.

DIAZ
VARELA
JOSE -
32782379L

Firmado digitalmente por DIAZ
VARELA JOSE - 32782379L
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=32782379L,
sn=DIAZ VARELA,
givenName=JOSE, cn=DIAZ
VARELA JOSE - 32782379L
Fecha: 2017.06.19 10:09:52
+02'00'

Asdo. José Díaz Varela

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: 2017.06.19 09:16:46
+02'00'

Asdo. Javier Veloso Freire

Índice

1. Resumo.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Enfermedades das plantas.....	2
2.2. <i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr.....	2
2.3. <i>Capsicum annuum</i> L. cv Padrón.....	6
2.4. Resistencia inducida das plantas e métodos de control das enfermidades.....	8
2.5. Extractos de algas como antimicrobianos e indutores de resistencia.....	9
2.5.1. Introducción.....	9
2.5.2. <i>Himanthalia elongata</i> (L.) Gray.....	10
2.5.3. <i>Undaria pinnatifida</i> (Harvey) Suringar.....	12
3. Obxectivos.....	13
4. Materiais e métodos.....	13
4.1. Material vexetal.....	13
4.2. Material patóxeno.....	13
4.3. Preparación do extracto.....	14
4.4. Determinación de compostos fenólicos solubles totais.....	14
4.5. Ensaio de xerminación.....	15
4.6. Ensaio de indución.....	15
4.7. Análise estatístico.....	16
5. Resultados.....	16
5.1. Determinación de compostos fenólicos solubles totais.....	16
5.2. Ensaio de xerminación.....	17
5.3. Ensaio de indución.....	20
6. Discusión.....	21
7. Conclusións.....	24
8. Bibliografía.....	25

1. Resumo

Botrytis cinerea é un patóxeno fúnxico necrotrófico que ataca a unha ampla gama de cultivos. As algas mariñas producen metabolitos secundarios con actividade antiviral, antimicrobiana e antioxidante. As algas pardas son os únicos organismos que producen florotaninos (polifenóis con actividade antibacteriana), e nese grupo atópanse *Himanthalia elongata* e *Undaria pinnatifida*. Neste traballo empregáronse extractos de ámbalas dúas algas para comprobar a súa posible actividade fungicida contra *B. cinerea*, así como a súa capacidade de indución de resistencia en *Capsicum annuum*. Os extractos de *U. pinnatifida* non contiñan fenóis, mentres que os de *H. elongata* si. Os resultados mostraron ademais que os extractos das algas non tiñan actividade fungicida contra *Botrytis*, senón que estimulaban a xerminación dos seus conidios, así como o crecemento do tubo xerminativo. Por outra banda, os extractos das algas amosaron a capacidade de inducir resistencia en pemento contra *B. cinerea*.

Resumen

Botrytis cinerea es un patógeno fúngico necrotrófico que ataca a una amplia gama de cultivos. Las algas marinas producen metabolitos secundarios con actividad antiviral, antimicrobiana y antioxidante. Las algas pardas son los únicos organismos que producen florotaninos (polifenoles con actividad antibacteriana), y en ese grupo se encuentran *Himanthalia elongata* y *Undaria pinnatifida*. En este trabajo se utilizan extractos de ambas algas para comprobar su posible actividad fungicida contra *B. cinerea*, así como su capacidad de inducción de resistencia en *Capsicum annuum*. Los extractos de *U. pinnatifida* no contenían fenoles, mientras que los de *H. elongata* sí. Los resultados mostraron además que los extractos de las algas no tenían actividad fungicida contra *Botrytis*, sino que estimulaban la germinación de sus conidios, así como el crecimiento del tubo germinativo. Por otra banda, los extractos de las algas mostraron la capacidad de inducir resistencia en pimiento contra *Botrytis cinerea*.

Abstract

Botrytis cinerea is a necrotrophic fungal pathogen that attacks a wide range of crops. Seaweed produces secondary metabolites with antiviral, antimicrobial and antioxidant activity. Brown algae are the only organisms that produce phlorotannins (polyphenols with antibacterial activity), and *Himanthalia elongata* and *Undaria pinnatifida* belong to such a group. In this work, extracts of both algae were used to verify their possible fungicidal activity against *B. cinerea*, as well as their ability to induce resistance in *Capsicum annuum*. The extracts of *U. pinnatifida* did not contain phenols, whereas those of *Himanthalia elongata* did. The results also showed that the extracts of the algae had no fungicidal activity against *Botrytis*, but stimulated the germination of their conidia, as well as the growth of the germ tube. On the other hand, the extracts of algae showed the ability to induce resistance in pepper against *B. cinerea*.

2. Introducción

2.1. Enfermedades das plantas

Existen unha gran cantidade de factores que poden influír na saúde dunha planta, como poden ser as características do solo, as necesidades hídricas e nutricionais da propia planta ou factores ambientais como a luz, a temperatura e a humidade. Todo isto, xunto con lesións mecánicas ou químicas, pode facilitar a aparición de enfermidades. Estas teñen gran relevancia, xa que datos estatísticos indican que as perdas anuais a nivel mundial producidas por enfermidades en diferentes cultivos son dun 13,3%, cun valor próximo aos oitenta mil millóns de dólares a comezos dos anos 90 (Carrillo *et al.*, 2004).

As enfermidades das plantas poden deberse a axentes bióticos como fungos, virus, fitoplasmas, bacterias, nematodos, protozoos e fanerógamas parásitas (Jiménez e Montesinos, 2010). Estes axentes poden ser patóxenos, é dicir, obteñen os nutrientes esenciais, a auga e o necesario para a reprodución da planta hóspede.

Dentro dos fungos, que son os que nos interesan para este traballo, poden existir ata 13 tipos básicos de enfermidades clasificadas en función das súas características xerais: mildius, oídios, roias, tizóns, agallas, roñas, necrosis foliares, antracnosis e podredumes de froitos, chancros, marchiteces vasculares, podredumes de raíces e pescozo, morte, podredumes do tronco e alteracións da madeira e negrillas (García Jiménez *et al.*, 2010).

O axente patóxeno no que nos centraremos neste traballo é *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., do que falaremos no seguinte apartado.

2.2. *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.

Para comezar, a clasificación taxonómica sería a seguinte:

Taboa 1. Xerarquía da clasificación taxonómica de *Botrytis*

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycotina
Clase	Leotiomycetes
Orden	Helotiales
Familia	Sclerotinicaeae
Xénero	<i>Botrytis</i>

Botrytis cinerea Pers.:Fr. é un patóxeno fúnxico necrotrófico, é dicir, mata as células da planta hóspede e logo coloniza os tecidos mortos. Esta especie chegou a considerarse o segundo fitopatóxeno máis perigoso en todo o mundo,

xa que ataca a máis de 200 cultivos (AbuQamar *et al.*, 2016). *B. cinerea* é o estado asexual (anamórfico) do ciclo de vida. A súa fase sexual (teleomórfica) denomínase *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (García Jiménez *et al.*, 2010).

Un problema desta e doutras especies patóxenas é a aplicación inadecuada de fungicidas e, no caso de *B. cinerea*, a súa alta variabilidade xenética, xa que así xorden con máis facilidade as cepas resistentes aos fungicidas (Kim *et al.*, 2016).

A infección por este patóxeno pódese describir nas seguintes etapas:

- Penetración da superficie do hóspede: entra producindo enzimas degradativas e causando un estalido oxidativo en lugar de usar presión física, posto que desenrola diferentes estruturas de penetración que acumulan H₂O₂ (Choquer *et al.*, 2007).

- Morte do tecido (segregando fitotoxinas) ou formación de lesión primaria: tratase dun fungo oportunista que ataca a tecidos débiles, danados ou senescentes a través de feridas ou sitios previamente infectados (Elad e Evensen, 1995).

- Expansión da lesión ou maceración dos tecidos: ao ser un fungo necrotrofo, contén múltiples enzimas que degradan as paredes celulares (CWDEs, *Cell Wall Degrading Enzymes*) permitindo a colonización dos tecidos vexetais e a liberación de carbohidratos para o consumo polo fungo (Choquer *et al.*, 2007).

- Esporulación: é un proceso de diferenciación celular no que se xeran as esporas necesarias para a dispersión (non para o proceso de infección) e o comezo dun novo ciclo infeccioso noutro hóspede.

A infección polo patóxeno vese pouco afectada pola temperatura dentro do rango de 5-26°C, pero está moi afectada pola humidade atmosférica. Así, o período mínimo empregado para a infección en "aire saturado" é de 15 h (Wakeham *et al.*, 2016). Debe terse en conta que a idade fisiolóxica dos tecidos da planta hóspede é un factor importante que determina a incidencia e a gravidade da infección por *Botrytis* (Coertze e Holz, 1999).

Entón, esta especie contén estratexias de penetración, infección e colonización para suprimir as defensas das plantas, mediado por enzimas líticas, toxinas, especies reactivas de osíxeno (ROS) inducidas por estrés, proteínas segregadas pola necrose e un gran grupo de metabolitos (Choquer *et al.*, 2007).

Unha das enfermidades máis importantes causadas por *B. cinerea* é o mofo gris da vide ou podredume gris das uvas. O fungo ataca ao acio (**Figura 1**), podendo afectar tamén a calquera parte verde da vide (Gjaerum *et al.*, 1998).



Figura 1: *Botrytis* da vide ou podredume gris no froito da viña. Tomado de <http://www.vitivinicultura.net/botritis-o-podredumbre-gris-botrytis-cinerea-pers.html>. (Barber, 2014).

Pode atacar entón ás partes herbáceas da vide, como as xemas e brotes xuvenís que necrosan e secan. Como se pode ver na **Figura 2**, algunhas follas poden amosar grandes manchas necróticas de cor pardo-vermello no borde da lámina da folla (Gjaerum *et al.*, 1998).

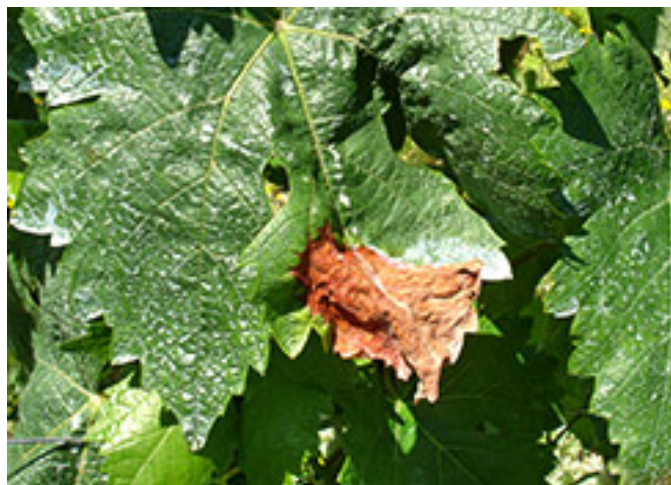


Figura 2: *Botrytis* ou podredume gris na folla da vide. Tomado de <http://misteladeteulada.com/agricultor-cuaderno-de-campo-plagas-y-enfermedades-brotitis-podredumbre/>. (Llobell, 2014).

Ademais de producir a podredume gris, pode afectar a outros hóspedes, de xeito que na leituga (**Figura 3**) ou na herba do canónigo desenrola lesións pardas sobre as follas e en caraveis e numerosas plantas de xardín produce murcha nas flores (Gjaerum *et al.*, 1998).



Figura 3: Podredume branca na leituga. Tomado de <http://agronoticias2012.blogspot.com.es/2016/03/enfermedades-en-hortalizas-de-hojas.html>. (Anónimo, 2016).

Pode afectar tamén a froitos de fresa (Figura 4), feixón, tomate (Figura 5), pemento, mazá, etc, onde forma unha podredume branca que se estende con rapidez (Gjaerum *et al.*, 1998).



Figura 4: O patóxeno fúnxico *Botrytis* causa mofo nas fresas. Tomado de <http://www.croma440.com/hongo-patogeno-agresivo-provoca-moho-en-frutas-verduras/>. (Anónimo, 2014).



Figura 5: Podredume gris ocasionada por *Botrytis cinerea* sobre froitos de tomate. Tomado de <https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/98801-Hongos-saprofitos-como-herramientas-de-control-biologico-de-Botrytis-cinerea-en-tomate.html> Dal Bello *et al.*, 2012).

2.3. *Capsicum annuum* L. cv Padrón

O hóspede utilizado neste traballo para a inoculación con *Botrytis* é *Capsicum annuum* L., coa seguinte clasificación taxonómica:

Táboa 2. Xerarquía da clasificación taxonómica do pemento

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Subfamilia	Solanoideae
Xénero	<i>Capsicum</i>

O pemento é moi consumido no noso país, podendo atoparse tanto en presentación seca como en fresca. A produción en España no 2014 foi de máis de 3000 toneladas de pemento seco e de máis de un millón de toneladas de pemento fresco (FAOSTAT, 2017).

A nivel mundial, a área de produción en seco (**Figura 6**) é moito mais reducida que en fresco (**Figura 7**).

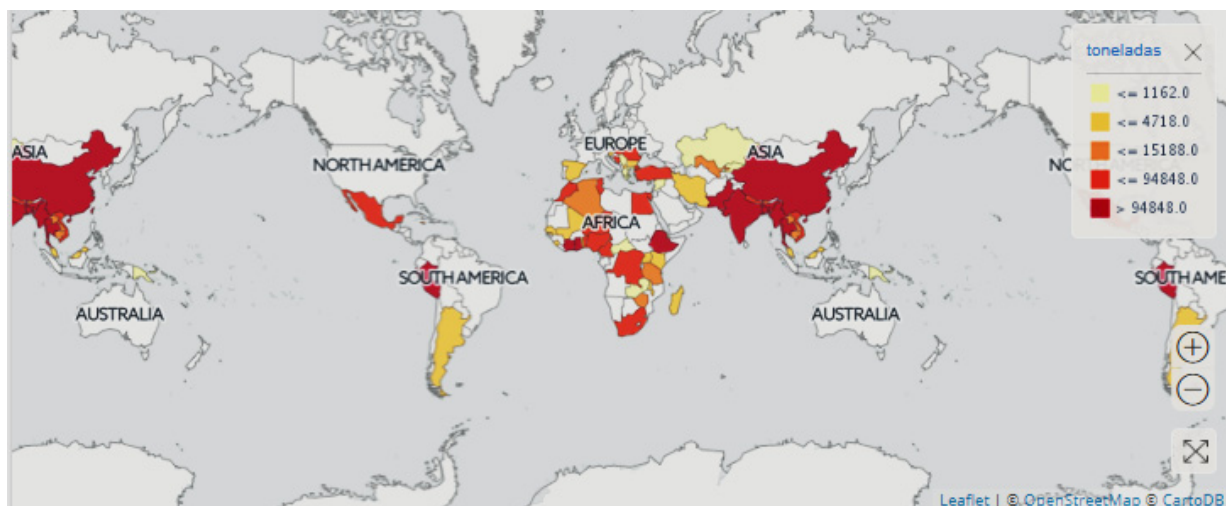


Figura 6: Distribución mundial do cultivo de pemento seco en 2014 (FAOSTAT, 2017).

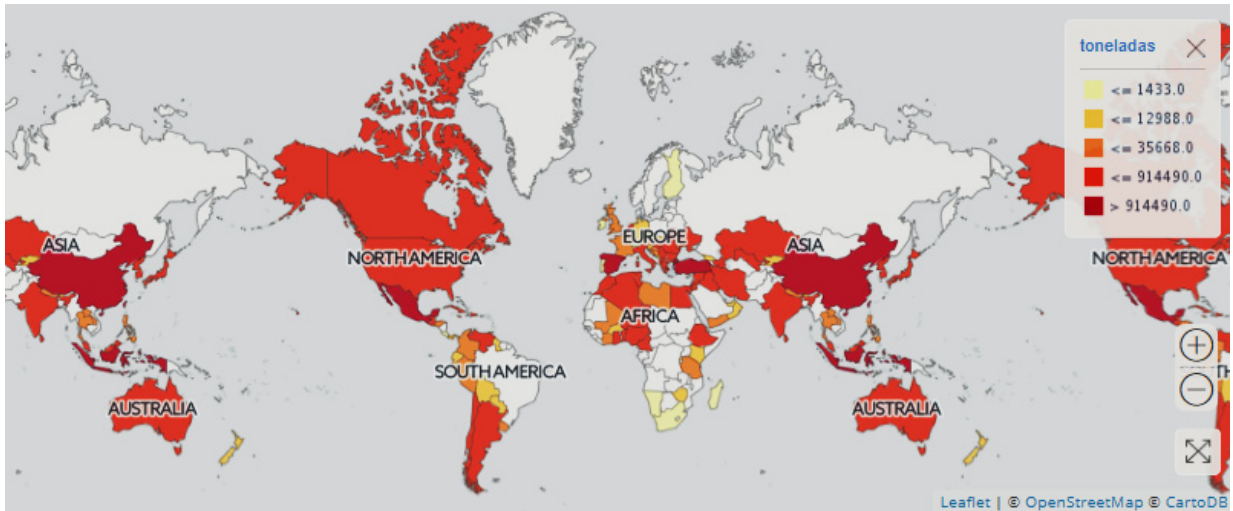


Figura 7: Distribución mundial do cultivo de pemento fresco en 2014 (FAOSTAT, 2017).

Asia é o maior produtor de pemento en seco do mundo, namentres que Europa só é responsable dun 2,7% da súa produción (Figura 8). No caso dos pementos en fresco, Asia segue sendo o continente con máis produción, pero en Europa incrementa o porcentaxe ata un 9,3% (Figura 9) (FAOSTAT, 2017).

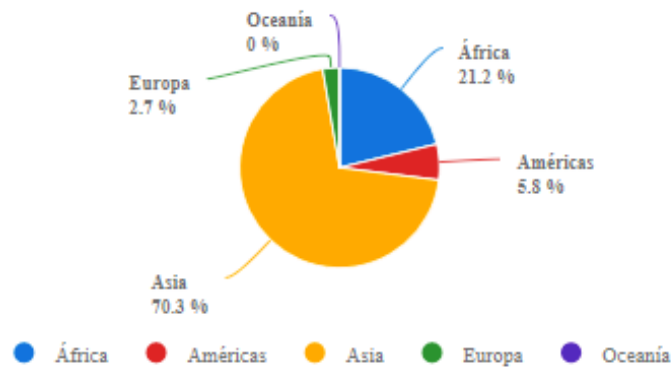


Figura 8: Producción de pemento en seco por continente (FAOSTAT, 2017).

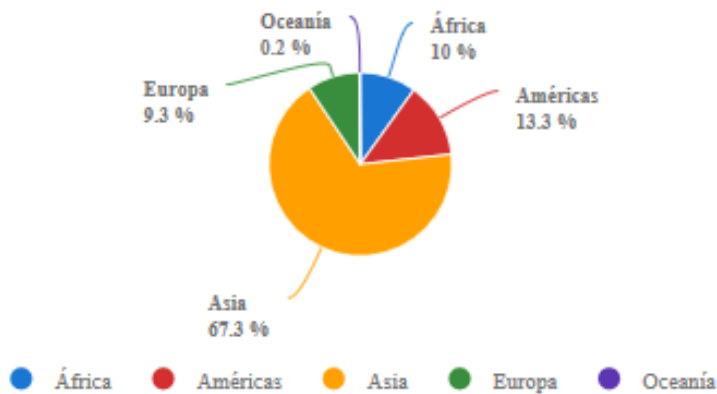


Figura 9: Producción de pemento en fresco por continente (FAOSTAT, 2017).

2.4. Resistencia inducida das plantas e métodos de control das enfermidades

Cando unha planta entra en contacto cun patóxeno é capaz de detectar o microbio e incrementar as súas defensas. Este nivel de defensas elevadas non depende do xenotipo, senón da activación de determinados xenes PR (*pathogen-related genes*). Isto é a resistencia inducida, na que distinguimos os seguintes tipos principais (Carrillo *et al.*, 2004):

-Resistencia sistémica adquirida (SAR): resposta inducida pola necrose dun tecido que conduce á resistencia xeneralizada en toda a planta. O ácido salicílico participa na resposta SAR e, durante esta, actívanse moitas proteínas PR relacionadas coa patoxénese.

-Resistencia sistémica inducida (ISR): resposta inducida que conduce á resistencia xeneralizada. Esta resistencia é independente da acumulación de ácido salicílico e, neste caso, a expresión de proteínas PR só se da ao entrar en contacto co patóxeno, denominándose este proceso como “priming”.

-Resistencia inducida por herbívoros/feridas: proceso similar ó anterior inducido por estímulos fronte a herbívoros ou danos mecánicos.

Estas respostas poden ser tamén clasificadas segundo o estímulo que as induce, podendo ser: PTI (inmidade desencadeada por PAMPs, patróns moleculares asociados a patóxenos) e ETI (inmidade desencadeada por efectores). Na primeira, os PAMPs (compoñentes estruturais dunha gran cantidade de patóxenos, como a flaxelina bacteriana ou a quitina fúnxica) son recoñecidos polos receptores de recoñecemento de patróns (PRRs). No caso da ETI están implicados os efectores (moléculas de especies, razas ou cepas específicas que contribúen á virulencia do patóxeno, e poden ser recoñecidas por proteínas R). En xeral, ambos tipos de inmidade dan respostas similares, pero a inmidade desencadeada por efectores é máis rápida e máis forte, podendo desencadear unha resposta hipersensible (HR) (Dodds e Rathjen, 2010).

En canto aos métodos de control que poden empregarse contra as enfermidades causadas por fungos, atopamos o uso de produtos químicos como funxicidas, o control biolóxico con outros organismos que atacan ao fungo, o desenrolo de plantas resistentes ao ataque mediante mellora xenética ou unha combinación distes (Carlile e Watkinson, 2001).

A aplicación de funxicidas en plantas é moi común na agricultura para facer fronte aos fungos patóxenos, existindo a posibilidade de que o patóxeno desenrole cepas mutantes resistentes. É o caso de *Botrytis*, posto que segundo algúns autores a proporción de illados resistentes é considerable en viñedos

franceses (Carlile e Watkinson, 2001). Ademais, *B. cinerea* é resistente aos benzimidazoles, un axente antifúngico que actúa interferindo coa división nuclear e bloqueando o crecemento adicional do micelio (Isaac, 1992).

2.5. Extractos de algas como antimicrobianos e indutores de resistencia

2.5.1. Introducción

De maneira natural os organismos vexetais producen sustancias antimicrobianas que confiren resistencia ou tolerancia fronte axentes patóxenos. Estas sustancias antimicrobianas de orixe vexetal úsanse para protexer tanto á planta como a partes colleitadas ou conservadas de esta (fundamentalmente sementes), ou ben a ambas (Carrillo *et al.*, 2004). As algas producen de maneira natural moitas de estas sustancias, como son por exemplo polifenóis, péptidos, aminoácidos e proteínas, lípidos e pigmentos, entre os cales, os polisacáridos por exemplo, mostran actividade anticoagulante, antiviral, antiinflamatoria, antialérxica, antioxidante, antitumoral, etc. Os compostos fenólicos obtidos das algas son tamén un bo exemplo, xa que teñen actividade antioxidante, antiproliferativa, antibiótica, antidiabética, anti-VIH, antialérgica e antiinflamatoria (Kadam *et al.*, 2015).

Existen estudos nos que se recolle o potencial antibacteriano e antifúngico das algas mariñas, onde se viu que un 70% das algas actuaba contra patóxenos bacterianos pero só un 27.5% contra patóxenos fúngicos (Padmakumar e Ayyakkannu, 1997).

Hai tamén estudos nos que se comproba que nas plantas tratadas con extractos de algas rexístranse melloras na xerminación das sementes, no rendemento e unha maior resistencia ás enfermidades, polo que se pensa que actúan como indutores da defensa da planta (Cluzet *et al.* 2004).

Poden utilizarse diferentes métodos (extracción de fluídos supercrítica, extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonidos, extracción asistida por enzimas e extracción líquida presurizada) para obter compostos biolóxicamente activos a partir de biomasa de algas e sen perda de actividade (Michalak e Chojnacka, 2015). A selección dun destes métodos levase a cabo de acordo coa natureza predita dos compostos bioactivos extraídos (Michalak *et al.*, 2015).

A composición química das algas mariñas varía segundo as especies, a localización, as condicións de cultivo e a tempada de colleita (Kadam *et al.*, 2015). Aínda así, os tres tipos de algas (verdes, vermellas e pardas) posúen metabolitos que poden ser útiles para inhibir bacterias, virus, fungos e outros epibiontes. Estes son metabolitos secundarios complexos orixinados como

resposta á presión ecolóxica (competencia polo espazo, a predación, as variacións das mareas, etc.). Algúns destes compostos son antimicrobianos e inhiben ou limitan o desenvolvemento e crecemento de outros microorganismos competitivos (Pérez *et al.*, 2016).

Entón, todos os tipos de algas producen metabolitos secundarios con actividade antiviral, antimicrobiana e antioxidante. Exemplos destes metabolitos secundarios son os alcaloides, os flavonoides e os compostos fenólicos (Cox *et al.*, 2013). As algas pardas destacan por riba das verdes e vermellas, xa que son os únicos organismos que producen florotaninos (polifenóis con actividade antibacteriana) (Belda *et al.*, 2016). As algas escollidas para este traballo son *Himanthalia elongata* (L.) Gray e *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. Trátase de algas pardas, unha das razóns polas que esperaríamos que tiveran fenóis.

2.5.2. *Himanthalia elongata* (L.) Gray

En canto á taxonomía desta alga parda, pode verse recollida na seguinte táboa:

Táboa 3. Xerarquía da clasificación taxonómica da alga *Himanthalia elongata*.

Reino	Protoctista
División	Heterokontophyta
Clase	Phaeophyceae
Orden	Fucales
Familia	Himanthaliaceae
Xénero	<i>Himanthalia</i>

H. elongata caracterízase por un ciclo de vida monoxenético. Ao tratarse dun alga da orde Fucales está provista duns abultamentos de superficie rugosa nos talos (receptáculos) que conteñen os conceptáculos, onde se desenrolan as células encargadas da reprodución sexual. Na primavera brotan unhas características cintas chamadas correas, que son os receptáculos citados anteriormente e que poden dividirse dicotómicamente ata os 3 metros (Cremades *et al.*, 1998), como se aprecia na [Figura 10](#).



Figura 10: *Himanthalia elongata* (L.) Gray. Tomado de <https://www.asturnatura.com/especie/himanthalia-elongata.html>. (Gray, 2004).

Dentro das aplicacións desta alga sábese que nos últimos anos se está a explotar o seu interese culinario. Así, algúns industriais en Galicia enlátana xunto con gónadas de ourizo de mar. Fóra de España, na Bretaña Francesa, é unha especie moi utilizada para o abono de cultivos de alcachofa (Cremades *et al.*, 1998).

Ademais, hai estudos que destacan a posible aplicación de extractos de *Himanthalia elongata* contra o estrés oxidativo e, polo tanto, a capacidade de atenuar os efectos nocivos de lesións. Isto basease na estreita relación entre a actividade antioxidante e o contido total fenólico nos extractos das algas, aínda que hai autores que demostraron o contrario (Belda *et al.*, 2016). De feito, existe un estudo no que se demostrou que *H. elongata* ten unha forte actividade antimicrobiana e unha gran capacidade antioxidante, as cales poden ser debidas aos polifenóis desta (incluíndo taninos e flavonoides) (Rajauria *et al.*, 2013), podendo mellorar así a vida de almacenamento dos alimentos e reducindo a oxidación dos lípidos debido aos niveis fitoquímicos presentes (Cox e Abu-Ghannam, 2013).

Existen máis estudos nos que se comprobou a capacidade antimicrobiana de *H. elongata* (Cox *et al.*, 2013). Neste estudo veuse como o extracto da alga foi capaz de penetrar as células da bacteria *Salmonella abony* inhibindo seu crecemento.

2.5.3. *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar

Neste caso, a clasificación desta alga parda sería a seguinte:

Táboa 4. Xerarquía da clasificación taxonómica da alga *Undaria pinnatifida*.

Reino	Protoctista
División	Heterokontophyta
Clase	Phaeophyceae
Orden	Laminariales
Familia	Alariaceae
Xénero	<i>Undaria</i>

U. pinnatifida é unha especie anual que se une ao substrato mediante rizoides moi ramificados dos que emerxe un estipe ou caulóide máis ou menos aplanado que se prolonga como nervio medio dunha gran lámina ou filoide, como se ve na **Figura 11**. Esta morfoloxía corresponde aos esporófilos, os cales presentan os corpos reprodutores (soros de esporocistes) (Cremades *et al.*, 1998).



Figura 11: *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. Tomado de <http://doris.ffessm.fr/Especies/Wakame3>. (Wacquant *et al.*, 2012).

Este alga alimentaria coñecida como “wakame” é a nivel mundial a segunda especie en importancia na alimentación do home. Cabe dicir ademais que actualmente non existen en España cultivos industriais de algas bentónicas con fines alimenticios pero, aínda así, realizáronse algunhas experiencias encamiñadas ao cultivo de estas en laboratorio e no mar (Cremades *et al.*, 1998).

Hai estudos nos que se comprobou a actividade antioxidante da glicoproteína de *U. pinnatifida* (UPGD), así como de protección do DNA durante o proceso de dixestión (Rafiquzzaman *et al.*, 2013). Así mesmo, existen investigacións nas que se estuda a capacidade antimicrobiana desta alga, onde se viu que unha película de UPP (proteína de *Undaria*) e vanilina ten actividade inhibidora fronte a *E. coli* (Yang *et al.*, 2017).

Patra *et al.* (2017) indicaron que este alga tiña, ademais dun gran potencial antioxidante, un potencial antibacteriano elevado grazas á presenza de varios compostos bioactivos como o n-hexanal, o fenil acetaldéido, o ácido tetradecanoico e o ácido pentadecanoico, sendo capaz de inhibir, por exemplo, a bacterias como *Staphylococcus aureus* (Gram +) e *Salmonella typhimurium* (Gram -).

Noutro estudo sobre o efecto destas dúas algas (*H.elongata* e *U.pinnatifida*) sobre a actividade α -glucosidasa e a difusión de glucosa, observouse cómo se reducían con extractos acuoso e etanólico de ambas. Polo tanto, estas algas tamén parecen adecuadas para o desenrolo de alimentos con propiedades hipoglucemiantes (Moreira *et al.*, 2014).

3. Obxectivos

- Determinar o contido en fenóis de *Himanthalia elongata* e *Undaria pinnatifida*.
- Comprobar a actividade fungicida *in vitro* dos extractos de ambas algas contra *B. cinerea*.
- Avaliar a actividade indutora dos extractos de algas contra o devandito patóxeno en pemento (*Capsicum annum* L. cv Padrón)

4. Materiais e métodos

4.1. Material vexetal

Neste traballo empregamos dúas especies de algas: *Himanthalia elongata* (espagueti de mar) e *Undaria pinnatifida* (wakame), as cales se compraron en presentación deshidratada comercial da empresa Portomuiños.

Empregamos ademais plántulas de pemento (*Capsicum annum* L. cv Padrón), que sementamos en vermiculita humedecida coa solución nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). Mantivéronse nunha cámara cunhas condicións de 16 horas de luz a 25°C e 8 horas de escuridade a 18°C durante 14 días, despois dos que transplantamos as plántulas cun mellor aspecto a pocillos de plástico cunha mestura de perlita e terra nunha proporción 3:1 (v/v), manténdose na cámara outros 7 días.

4.2. Material patóxeno

Como material patóxeno empregouse o illado B0510 de *Botrytis cinerea*, manténdose mediante sucesivos repicados no medio PDA (*Potato Dextrose*

Agar), como se pode ver na **Figura 12**. Este fungo deixouse crecer durante 10 días nese medio, nunha cámara a 23°C.

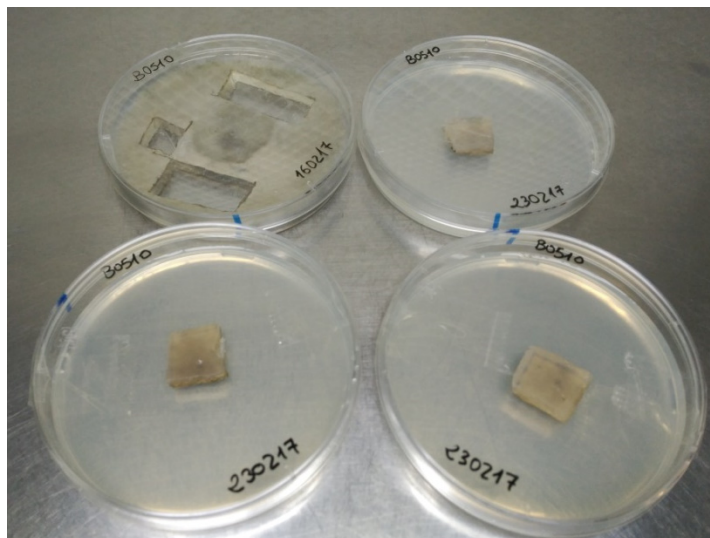


Figura 12: Placas Petri nas que se mantivo o illado mediante sucesivos repicados.

4.3. Preparación do extracto

Para preparar o extracto, homoxeneizamos en seco 0,3 gramos de cada alga, engadindo posteriormente 10 ml de metanol ao 80%. Recollemos este homoxeneizado nun tubo, que incubamos a 70°C durante 15 minutos.

A continuación, filtramos a través de papel de laboratorio a mestura obtida, enrasando con metanol ao 80% ata os 10 ml de volume final e axitando por inversión. Obtivéronse dous extractos por cada alga, empregados como mostra para medir o contido en compostos fenólicos solubles totais, realizar o ensaio de xerminación e o de resistencia inducida.

4.4. Determinación de compostos fenólicos solubles totais

Para determinar a concentración dos compostos fenólicos, preparamos varios tubos eppendorf: un para o branco e dous para cada unha das algas. No branco engadimos 50µl de metanol ao 80%, mentres que nos tubos eppendorf das mostras vertemos 50µl de cada unha. Engadimos 750µl de auga e 50µl de Reactivo de Folin-Ciocalteu a cada un, axitándoos e incubándoos durante 3 minutos a temperatura ambiente. Tras isto, engadimos 150µl de Na₂CO₃ ao 20%, volvendo axitar o tubo e incubando a temperatura ambiente durante 2 horas. Por último, axustamos a absorbancia a 0 no espectrofotómetro co branco, e medimos as absorbancias a 760 nm de cada mostra.

Preparouse unha recta de calibrado con solucións de ácido gálico en metanol ao 80% (de diferentes concentracións) para poder calcular a cantidade de fenóis presente nas mostras.

4.5. Ensaio de xerminación

Para realizar o ensaio de xerminación extraemos os conidios das placas onde mantiñamos o noso illado (B0510 de *Botrytis cinerea*). Seleccionamos entón unha placa que se atope ben esporulada para engadirlle 10 ml de auga estéril e raspamos vigorosamente cun asa de Digrafsky para favorecer o desprendemento dos conidios. Recollemos cunha micropipeta a auga que contén os conidios suspendidos, depositándoa nun tubo estéril a través dun filtro con lana de vidro estéril. Así, limpamos a suspensión, eliminando restos de micelio.

Centrifugamos durante 5 minutos a 1500 x g a suspensión para quedarnos co precipitado. Este, resuspendémolo en 1 ml de auga destilada para volver a centrifugar e lavar a nosa suspensión. O lavado é importante, xa que así eliminamos calquera sustancia que poda inhibir a xerminación do noso fungo.

Determinamos a concentración de conidios da suspensión, para o que necesitamos facer unha dilución inicial 1:10. Engadimos 25 μ l da nova suspensión á cámara Neubauer para facer o recuento. A partir da nosa suspensión obtivemos outra dunha concentración de 10^6 conidios/ml.

Preparamos varios portaobxectos escavados con 25 μ l do extracto de alga correspondente e 25 μ l de metanol ao 80%, os cales deixamos secar. Incubamos nunha cámara húmida estes portaobxectos escavados secos xunto con 25 μ l da suspensión de 10^6 conidios/ml. Mantivemos a cámara húmida a 23°C en escuridade durante 6 horas para a xerminación dos conidios. O experimento realizouse por duplicado utilizando dous extractos diferentes para cada alga.

Para poder observar con maior facilidade o porcentaxe de conidios xerminados e non xerminados, así como a lonxitude do tubo de xerminación, engadimos 15 μ l de azul de lactofenol a cada portaobxectos para tinguir a mostra logo de visualizar unha primeira vez sen esta tinguidura.

4.6. Ensaio de indución

Despois de 7 días do transplante aos pocillos de plástico as plántulas foron inducidas. Estas foron divididas en varias bandexas, dúas para o control e dúas para a indución con cada extracto de alga (dous por cada alga), utilizando 6 plantas para cada tratamento. Cada planta control foi pulverizada con 10 ml dunha solución cunha dilución 1:1000 de metanol ao 80% e auga destilada,

mentres que as plantas inducidas foron pulverizadas con 10 ml dunha solución cunha dilución 1:1000 do extracto de cada alga.

Ás 24 horas da indución, inoculamos as plántulas con *B. cinerea*. Cun sacabocados, obtivemos discos de micelio de 5 mm de diámetro. En cada plántula colocamos dous discos por folla. Estas plántulas incubáronse en caixas para manter unha humidade relativa alta, necesaria para a infección óptima do fungo. Para obter os resultados de cada tratamento medimos o diámetro das lesións causadas polo patóxeno a 48 horas da inoculación.

4.7. Análise estatístico

Para o análise estatístico empregamos o programa R. Realizamos a proba da χ^2 de Pearson ($\alpha=0,05$) para comparar os tratamentos dous a dous e comprobar se hai diferenzas significativas entre a proporción de conidios xerminados no control, no tratamento con *Himanthalia* e no tratamento con *Undaria*. Como os datos non son normais, utilizamos ademais a proba de distribución libre de Kruskal-Wallis (baseada en rangos), comparando si existen diferenzas significativas entre a lonxitude dos conidios xerminados, así como entre o diámetro da lesión producida por *Botrytis* no tratamento con cada unha das algas. Para determinar entre qué tratamentos se atopan as diferenzas significativas realizamos un Test de Dunn ($\alpha=0,05$).

5. Resultados

5.1. Determinación de compostos fenólicos solubles totais

En canto aos resultados obtidos na proba de determinación de compostos fenólicos, na **Figura 13** vese claramente como a cantidade de fenois é relativamente alta en *Himanthalia elongata*. En *Undaria pinnatifida* non se detectaron fenois.

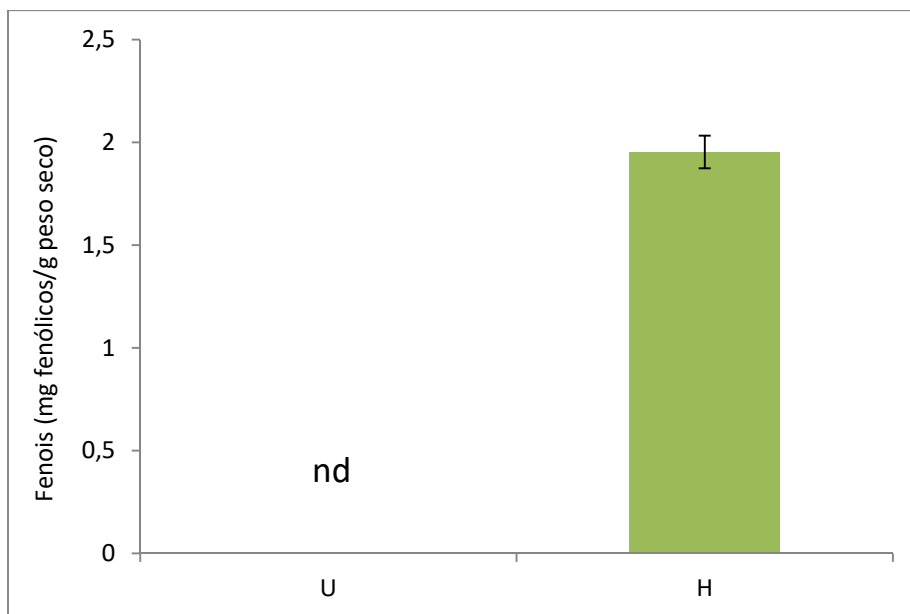


Figura 13: Contido fenólico obtido en *Himanthalia* (H) e en *Undaria* (U). Os datos son medias \pm o erro estándar. Nd - non detectado.

5.2. Ensaio de xerminación

Logo de engadir o lactofenol, a simple vista observamos que, en comparación co control (Figura 16), o número de conidios xerminados era moito maior nas preparacións cos extractos de *Himanthalia elongata* (Figura 17) e *Undaria pinnatifida* (Figura 18). Tamén percibimos que os tubos de xerminación dos conidios na preparación con *H.elongata* eran máis longos que no caso de *U.pinnatifida*.

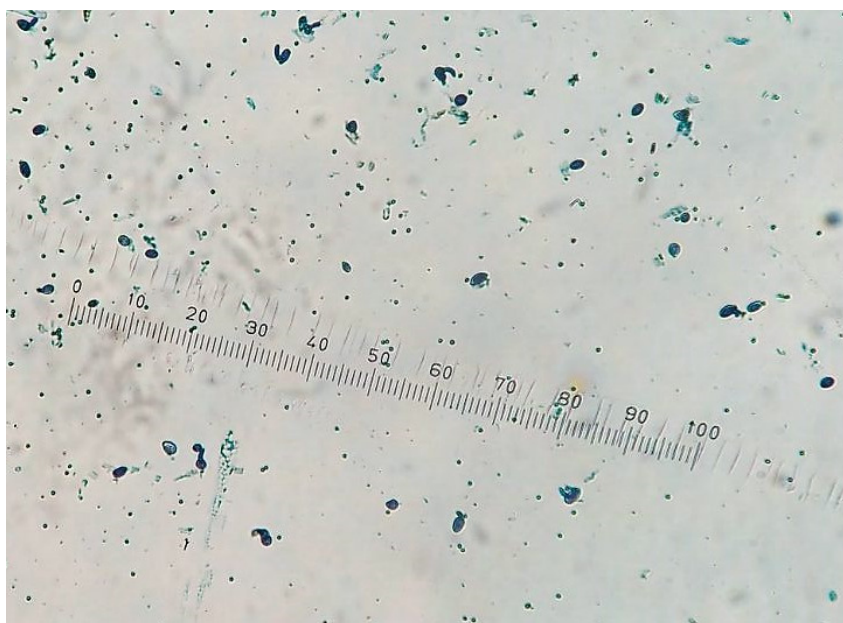


Figura 16: Preparación dos conidios con tratamento control. Unha división da escala equivale a 5 μ m.

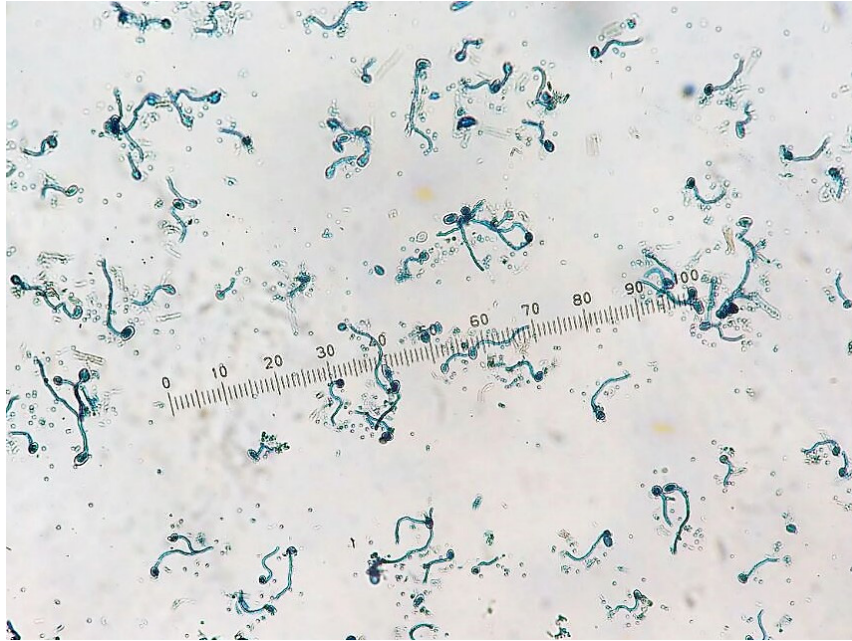


Figura 17: Preparación dos conidios tratados co extracto de *Himanthalia elongata*. Unha división da escala equivale a 5 μ m.



Figura 18: Preparación dos conidios tratados co extracto de *Undaria pinnatifida*. Unha división da escala equivale a 5 μ m.

Realizouse entón unha conta dun total de 100 conidios de *Botrytis cinerea* elixidos ao azar para determinar o número de conidios xerminados e non xerminados.

Tras realizar a conta, xunto cun análise estatístico (proba χ^2 de Pearson ($\alpha=0,05$)) comparando dous a dous o tratamento con cada unha das algas co control, podemos concluír que existen diferenzas significativas entre os tratamentos con extractos e o control (p -valor $< 2,2e-16$ en ambos casos). Concluimos ademais que non existen diferenzas significativas no número de

conidios xerminados entre os tratamentos con *Undaria* e con *Himanthalia* (p-valor=0,7456) (**Figura 19**).

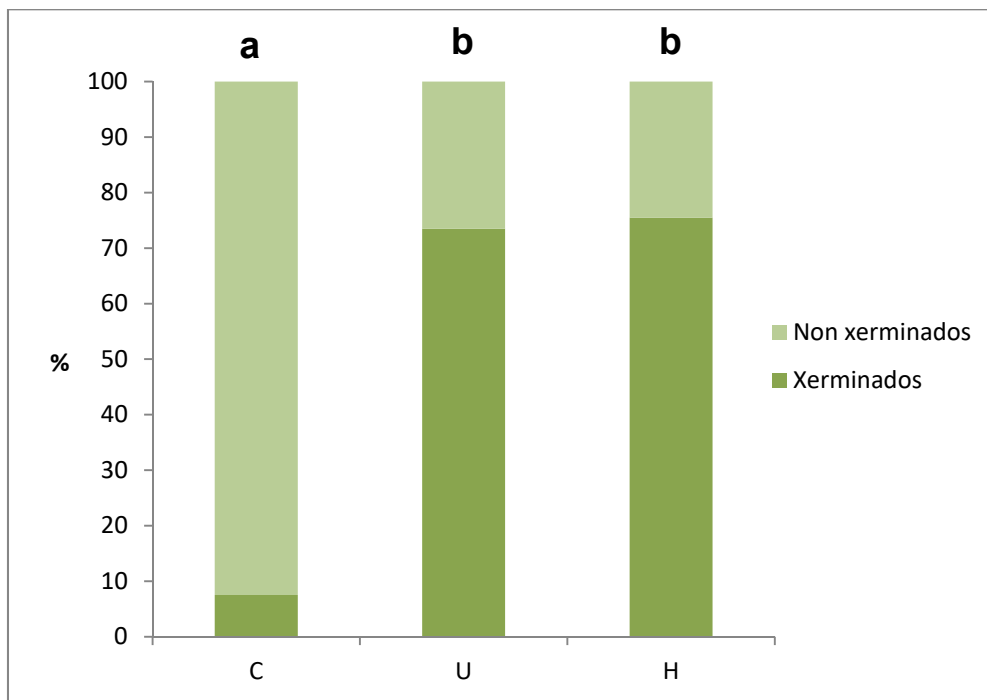


Figura 19: Efecto dos extractos das algas sobre a xerminación de conidios de *Botrytis cinerea*. Control (C), *Undaria pinnatifida* (U) e *Himanthalia elongata* (H). Letras diferentes indican diferenzas significativas ($\alpha=0.05$) na proba de χ^2 de Pearson.

Realizamos tamén unha medida da lonxitude do tubo de xerminación das esporas de *Botrytis* que xerminaron. A lonxitude foi distinta nos diferentes tratamentos (**Figura 20**). Ao realizar a proba de Kruskal-Wallis obtivemos un p-valor de 3,172e-09, polo que concluímos que as lonxitudes son significativamente diferentes nos tres casos.

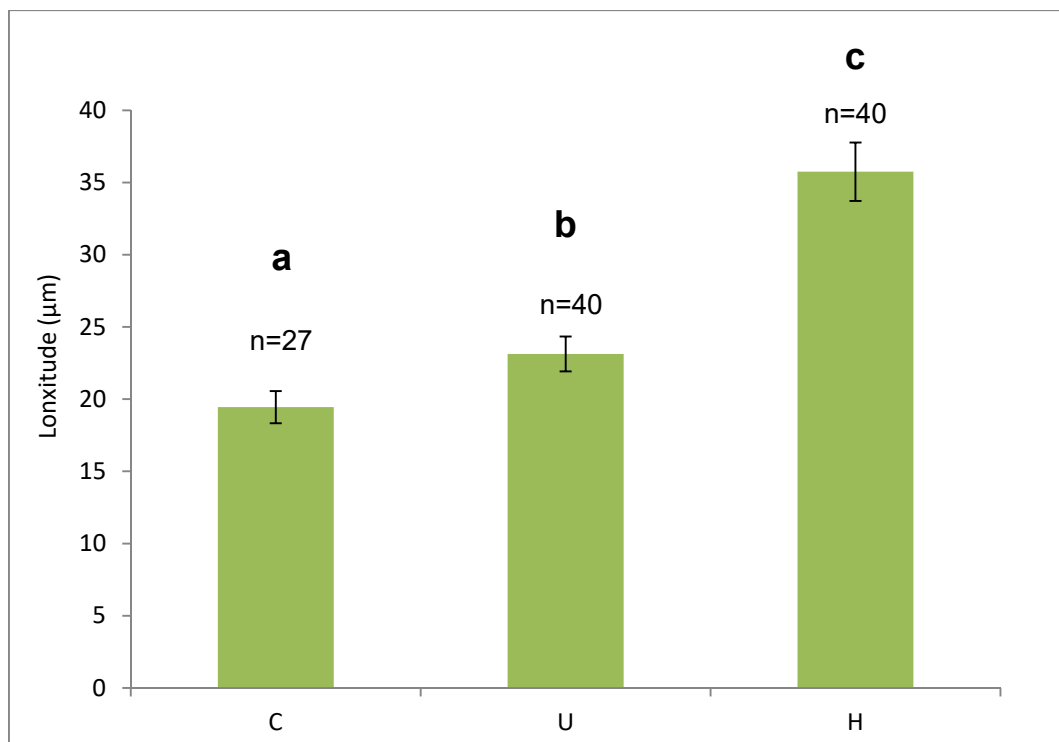


Figura 20: Efecto dos extractos das algas sobre a lonxitude dos conidios de *Botrytis cinerea*. Control (C), *Undaria pinnatifida* (U) e *Himanthalia elongata* (H). Os datos son medias \pm o erro estándar. Indicase o número de conidios medidos en cada caso. As diferentes letras indican as diferenzas significativas atopadas mediante a proba de Kruskal-Wallis e o test de Dunn ($\alpha= 0.05$).

Para precisar cales son os tratamentos que difiren realizamos o test de Dunn ($\alpha=0,05$) comparando dous a dous. Entre o control e *U.pinnatifida*, cun p-valor de $1,02e-01$, determinamos que a diferenza entre ambos é significativa, igual que entre o control e *H. elongata* (p-valor $6,64e-09$). Así, comparando o tratamento con cada unha das algas, obtivemos un p-valor de $1,96e-06$, polo que podemos concluír que existen diferenzas significativas entre ambos tratamentos sendo o efecto máis pronunciado no caso de *H. elongata*.

5.3. Ensaio de indución

Logo de 48 horas da inoculación, medimos o diámetro da lesión causada por *B. cinerea* en cada un dos tratamentos, podendo determinar así a área das lesións por folla (mm^2). Cos datos obtidos realizamos unha proba de Kruskal-Wallis para comprobar se existían diferenzas significativas entre o control, o tratamento con *Himanthalia* e o tratamento con *Undaria*, obtendo un p-valor de $8,511e-05$. Polo tanto, aceptaríamos que a área das lesións por folla non é a mesma para os tres tratamentos, como se pode ver na **Figura 21**.

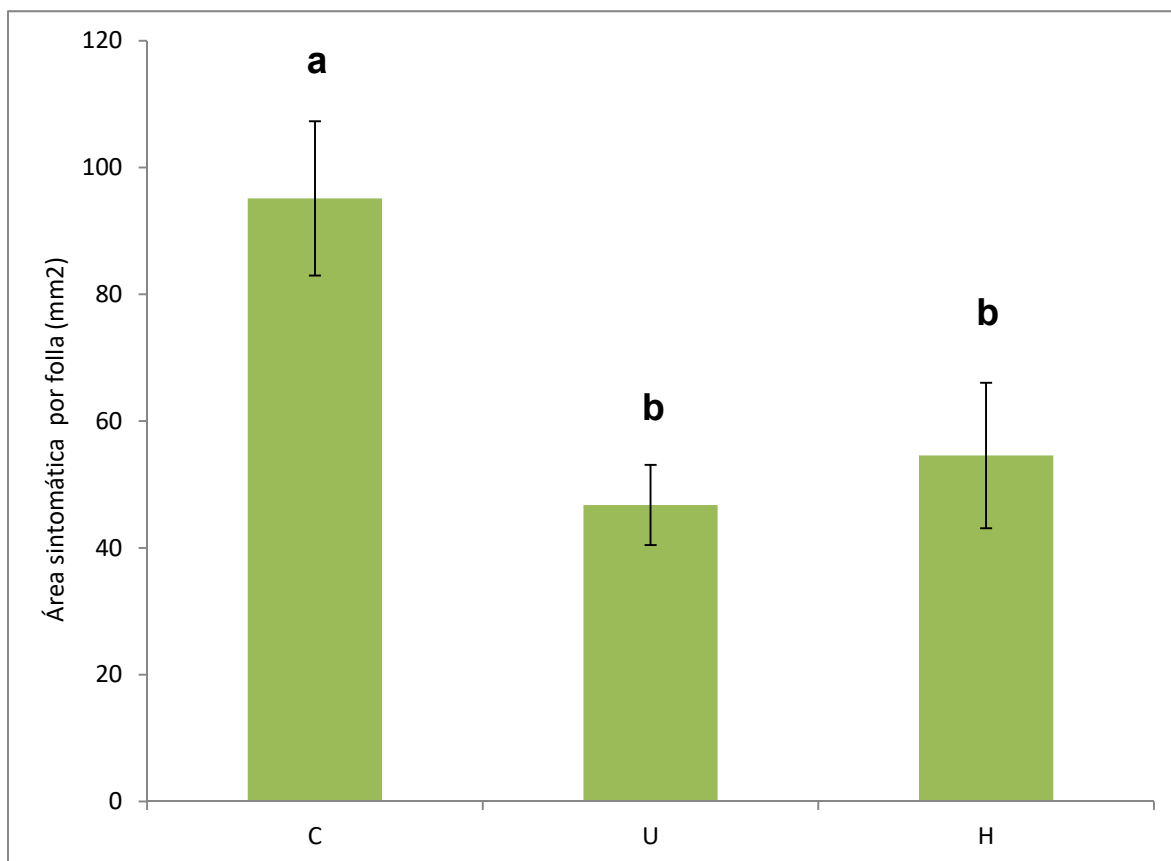


Figura 21: Área da infección con *Botrytis cinerea* en *Capsicum annuum* tralo tratamento cas dúas algas. Control (C), *Undaria pinnatifida* (U) e *Himanthalia elongata* (H). Os datos son medias \pm o erro estándar. As diferentes letras indican as diferenzas significativas atopadas mediante a proba de Kruskal-Wallis e o test de Dunn ($\alpha= 0.05$).

Para determinar cales son os tratamentos que difiren, realizamos unha comparación dous a dous co test de Dunn ($\alpha=0,05$). Comparando o control co tratamento con *U.pinnatifida*, obtivemos un p-valor de 0,014, concluíndo entón que existen diferenzas significativas entre ambos tratamentos. No caso do control e *H.elongata* o p-valor obtido é de 0,022. Polo tanto, deducimos que existen diferenzas significativas entre os dous tratamentos. Por último, comparando o tratamento coas dúas algas, obtivemos un p-valor de 0,931, polo que podemos dicir que non existen diferenzas significativas entre a indución con *Himanthalia elongata* e *Undaria pinnatifida* en pemento.

6. Discusión

Os fenos teñen moitas funcións nos vexetais, como a estabilización da estrutura, a protección contra os herbívoros, a protección contra a radiación ultravioleta (UV), o intercambio de información con simbioses ou os efectos biocidas contra bacterias e fungos (Daniel *et al.*, 1999). En particular, hai estudos que indican que a eficacia antimicrobiana dos extractos vexetais é debida a varios compostos

fenólicos, entre os que se atopan flavonoides, cumarinas e taninos, entre outros (Corato *et al.*, 2017). Polo tanto, esperaríamos que a cantidade de fenóis nas algas de estudo sexan elevados polas súas posibles propiedades antimicrobianas e antifúngicas. Así, obtivemos que a cantidade de fenóis contidos no extracto de *Undaria pinnatifida* foi nula, namentres que en *Himanthalia elongata* é elevada. Corato *et al.* (2017) obtiveron un total de compostos fenólicos en *U. pinnatifida* de 0,4%. A diferenza podería deberse á utilización de dous tipos distintos de alcohol como solvente (etanol fronte a metanol ao 80%).

Corato *et al.* (2017) comprobaron que o extracto de *U. pinnatifida* non é capaz de inhibir a xerminación dos conidios de *Botrytis cinerea* a unha dose de 30 g/L, mentres que ten unha capacidade de inhibición do 100% no crecemento do micelio. Así, no ensaio de xerminación do noso traballo comprobamos que o número de conidios xerminados de *Botrytis cinerea* era moito maior nos tratamentos con 30g/L dos extractos das algas (*U.pinnatifida* e *H.elongata*) que no control, o que nos indica que estas especies de algas mariñas, como indican Corato *et al.* (2017), non teñen actividade fungicida e, incluso, poderían estimular a xerminación do fungo. Neste traballo non determinamos o efecto dos extractos das algas no crecemento do micelio, co que non podemos botar conclusións sobre a capacidade fungicida das algas de estudo sobre o crecemento vexetativo do fungo.

No ensaio de xerminación tamén puidemos ver que a lonxitude do tubo de xerminación era maior nos tratamentos coas algas que no control e que, entre elas, *Himanthalia elongata* permitía un maior crecemento do tubo de xerminación, o que nos fai pensar que podería ser debido á cantidade de fenóis que esta contiña (1,95 mg de fenóis/g de peso seco). Normalmente, os fenóis soen ser tóxicos, reducindo a lonxitude do tubo xerminativo de moitos fungos, como *Aspergillus* (Rangel-Sanchez *et al.*, 2014). Entón, poderíase relacionar a indución do crecemento por *Botrytis* cos fenóis por fenómenos de co-evolución, onde os compostos tóxicos serven de atraentes despois dunha desintoxicación distes (Lattanzio *et al.*, 2006). É dicir, o patóxeno de estudo volveríase resistente aos fenóis, usándoos como sinais para localizar onde se atopa a planta.

Por outra parte, existen carbohidratos implicados na inmunidade das plantas como indutores das defensas das plantas e/ou indutores de resistencia fronte a patóxenos como os fucoidanos e os alxinatos, principais polisacáridos da matriz extracelular das algas pardas. De esta forma, cunha dose de 30g/L de *U. pinnatifida* (alga parda), redúcese o diámetro da lesión debida ao mofo gris (*B. cinerea*) na pel de varios froitos. Pode producirse unha inhibición de ata o 79% das lesións nas fresas, un 66% en melocotóns e un 58% en limóns (Corato *et al.*, 2017). *Ascophyllum nodosum* é outra alga parda con efectos sobre o patóxeno empregado no noso traballo, tendo unha capacidade de redución de ata un

53,5% da infección por *B. cinerea*, ademais de incrementar o rendemento da biomasa das plantas de cenoria (Jayaraj *et al.*, 2008).

Neste traballo, obtivemos unha visible capacidade de indución de resistencia dos extractos das algas contra *Botrytis* sobre pemento, xa que a área da lesión nas follas era menor nas plantas tratadas cos extractos de *Undaria* e *Himanthalia* (46,77 e 54,57 mm², respectivamente) fronte ao control (95,14 mm²). Ambos extractos algais reduciron a infección independentemente de que tivesen ou non fenos. Ademais, a magnitude na que se produce esta redución é semellante en ambos extractos. Da mesma maneira, a porcentaxe de xerminación de conidios de *Botrytis* veuse incrementado por ambos extractos de algas tamén de maneira independente dos fenos. É interesante o feito de que se produza unha indución da xerminación xa que, se ben é probable que existan azucres ou outras fontes de carbono das que se pode alimentar o conidio, e polo tanto inducir a súa xerminación, na concentración a que se preparou o extracto (1:1000) é pouco probable que estas sustancias poidan ser usadas como fonte de carbono o que nos inclina a pensar en mecanismos de sinalización. De maneira similar, a lonxitude do tubo xerminativo dos conidios de *Botrytis* incrementou co tratamento algal. Sen embargo, a diferenza da porcentaxe en xerminación, a lonxitude do tubo vese afectada pola presenza de fenos no extracto. O extracto con fenos, o da alga *Himanthalia*, presentou unha maior indución da lonxitude do tubo xerminativo.

Ademais dos fenos, nos extractos algais existen compostos doutra natureza que poden ser os responsables da protección que se observa neste traballo e que na presente investigación non foron medidos. Corato *et al.* (2017) indican que a capacidade de indución do crecemento nos conidios de *Botrytis* podería deberse aos ácidos graxos que se atopan nos extractos das algas. No caso de *U. pinnatifida*, predominan o ácido palmítico (32.5%) e o ácido araquidónico (14%).

Noutros traballos destacan outros compostos de *H. elongata* e *U. pinnatifida* implicados nas actividades antibacterianas, antifúngicas, antivíricas e antioxidativas que poden levar a cabo. No caso de *Himanthalia*, destacan (ademais dos ácidos graxos como o palmítico, palmitoleico e oleico) o fitol, o fucosterol e o neofitadieno na actividade antioxidativa, contra bacterias como *Staphylococcus aureus* e *E. coli* e contra fungos como *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. No caso de *Undaria*, destacan o galactofucano sulfatado, o fucano e o galactano, con actividade antivírica contra HSV-1 e 2 (virus da herpes simple) (Michalak e Chojnacka, 2015).

Ademais, as algas mariñas conteñen polisacáridos que poden desencadear as respostas de defensa das plantas. Un exemplo é a laminarina (β -D- (1 \rightarrow 3) glucano), clave nas algas pardas como *A. nodosum*, permitíndolle a indución do crecemento e defensa da planta mediante fitoalexinas antimicrobianas (Subramanian *et al.*, 2011).

Neste estudo compróbase polo tanto que os extractos de *Undaria pinnatifida* e *Himanthalia elongata* obtidos en metanol ao 80% son efectivos para protexer o pemento fronte a *Botrytis*. Os fenóis non teñen un papel importante na indución da resposta de defensa, xa que o noso extracto con metanol da alga *Undaria pinnatifida* foi capaz de inducir a mesma resposta de defensa apesares de carecer de niveis detectables de fenóis. Outros candidatos importantes como sustancias responsables da indución de resistencia son os polisacáridos. Está descrito que estes polisacáridos e os oligosacáridos derivados, actúan desencadeando un estalido oxidativo a nivel local, activando vías de sinalización de ácido salicílico, xasmónico ou etileno, acumulando proteínas e compostos con actividades antimicrobianas que determinan a protección contra os patóxenos (Vera *et al.*, 2011). Entón, comprobar o nivel destes compostos nos nosos extractos de *Undaria pinnatifida* e *Himanthalia elongata* é necesario para determinar o papel destes no efecto de protección sobre o pemento fronte a *Botrytis*.

7. Conclusións

- O extracto de *Himanthalia elongata* ten unha gran cantidade de fenóis, ao contrario que en *Undaria pinnatifida*, onde non se detectaron.
- *Himanthalia elongata* e *Undaria pinnatifida* non teñen actividade fungicida, senón que estimularon a xerminación dos conidios de *Botrytis cinerea* e o crecemento do tubo xerminativo.
- Tanto os extractos de *Himanthalia elongata* como os de *Undaria pinnatifida* teñen a capacidade de inducir resistencia en pemento contra *Botrytis cinerea*.

Conclusiones

- El extracto de *Himanthalia elongata* tiene una gran cantidad de fenoles, al contrario que en *Undaria pinnatifida*, donde no se detectaron.
- *Himanthalia elongata* y *Undaria pinnatifida* no tienen actividad fungicida, sino que estimulan la germinación de los conidios de *Botrytis cinerea* y el crecimiento del tubo germinativo.
- Tanto los extractos de *Himanthalia elongata* como los de *Undaria pinnatifida* tienen la capacidad de inducir resistencia en pimiento contra *Botrytis cinerea*.

Conclusions

- *Himanthalia elongata* extract has a large amount of phenolics, unlike in *Undaria pinnatifida*, where they were not detected.

- *Himanthalia elongata* and *Undaria pinnatifida* do not have fungicidal activity, but they stimulate the germination of the conidia of *Botrytis cinerea* and the growth of the germ tube.
- Both the extracts of *Himanthalia elongata* and those of *Undaria pinnatifida* have the ability to induce resistance in pepper against *Botrytis cinerea*.

8. Bibliografía

- AbuQamar, S.F., Moustafa, K. e Tran L.P. (2016). 'Omics' and plant responses to *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1658.
- Anónimo (2016). Podredume branda. Tomado de <http://agronoticias2012.blogspot.com.es/2016/03/enfermedades-en-hortalizas-de-hojas.html>, 22/03/2016.
- Anónimo (2014). O patóxeno fúnxico Botrytis causa mofo nas fresas. Tomado de <http://www.croma440.com/hongo-patogeno-agresivo-provoca-moho-en-frutas-verduras/>, 23/05/2016.
- Barber V.(2014). Botrytis da vide ou podredume gris en viña. Tomado de <http://www.vitivinicultura.net/botritis-o-podredumbre-gris-botrytis-cinerea-pers.html>, 07/04/2017.
- Belda, M., Sanchez, D., Bover, E., Prieto, B., Padrón, C., Cejalvo, D. e Lloris, J.M. (2016). Extraction of polyphenols in *Himanthalia elongata* and determination by high performance liquid chromatography with diode array detector prior to its potential use against oxidative stress. *Journal of Chromatography*, 1033, 334-341.
- Carlile, M.J. e Watkinson, S.C. (2001). Parasites and mutualistic symbionts. En Carlile, M.J. e Watkinson, S.C. (Eds.) *The fungi* (pp.307-367). San Diego: Academic press.
- Carrillo, J.M., Nuez, F. e Pérez de la Vega, M. (2004). La resistencia genética a patógenos vegetales y la mejora vegetal. En Carrillo, J.M., Nuez, F. e Pérez de la Vega, M. (Eds). *Resistencia genética a patógenos vegetales* (pp. 5-38). Valencia: Editorial de la UPV.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.M., Simon, A., et al.(2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and Polyphagous pathogen. *FEMS Microbiology Letters* 277, 1–10.
- Cluzet, S., Torregrosa, C., Jacquet, C., Lafitte, C., Fomicr, J., Mercier, L., Salamagne, S., Briand, X., Esquerre-Tugaye, M.T. e Dumas, B. (2004) Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva spp.* *Plant Cell and Environment*. 27, 917-928.
- Coertze, S. e Holz, G. (1999). Surface colonization, penetration and lesion formation on grapes inoculated fresh after cold storage with single airborne conidia of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 83, 917-924.

- Corato, D.U., Salimbeni, R., De Petris, A., Avella N. e Patrino, G. (2017). Antifungal activity of crude extracts from brown and red seaweeds by a supercritical carbon dioxide technique against fruit postharvest fungal diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 131, 16-30.
- Cox, S., Turley, G.H., Rajauria, G., Abu-Ghannam, N. e Jaiswal, A.K. (2013). Antioxidant potential and antimicrobial efficacy of seaweed (*Himanthalia elongata*) extract in model food systems. *Journal of Applied Phycology*, 26, 1823-1831.
- Cox, S. e Abu-Ghannam, N. (2013). Enhancement of the phytochemical and fibre content of beef patties with *Himanthalia elongata* seaweed. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 2239-2249.
- Cremades, J., Bárbara, I. e Veiga, A.J. (1998). Las macroalgas marinas y sus aplicaciones. Ferrol: Fondo de promoción de empleo.
- Dal Bello, G.M., Nico A.I. e Mónaco C.I. (2012). Podredume gris ocasionada por *Botrytis cinerea* sobre fritos de tomate. Tomado de <https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/98801-Hongos-sapofitos-como-herramientas-de-control-biologico-de-Botrytis-cinerea-en-tomate.html>, 06/06/2017.
- Daniel, O., Meier, M.S., Schlatter, J. e Frischknecht, P (1999). Selected phenolic compounds in cultivated plants: Ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 107, 109-114.
- Dodds, P.N. e Rathjen, J.P.(2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11, 539–548.
- Elad, Y. e Evensen, K.(1995).Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 85, 637–643.
- García Jiménez, J., Monte, E. e Trapero, A. (2010). Los hongos y oomicetos fitopatógenos. En Jiménez Diaz, R.M. e Montesinos Seguí, E. (Eds.). *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos* (pp.23-50). Valencia: Phytoma, S.L.
- Gjaerum, H.B., Tjamos, E.C. e Virányi. F. (1998). Ascomycetes V: Rhytismatales, Pezizales, Caliciales, Helotiales. En Smith I.M., Dunez, J., Lelliott, R.A., Phillips D.H. e Archer, S.A. (Eds.). *Manual de enfermedades de las plantas* (pp. 481-521). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Gray (2004). *Himanthalia elongata* (L.). Tomado de <https://www.asturnatura.com/especie/himanthalia-elongata.html>, 06/06/2017.
- Hoagland, D.R. e Arnon, D.I. (1950). The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347, 1-32.
- Isaac, S. (1992). *Fungal-Plant interactions*. Londrés: Chapman e Hall.

- Jayaraj, J., Wan, A., Rahman, M. e Punja, Z.K. (2008). Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. *Crop Protection*, 27, 1360-1366.
- Jiménez, R.M. e Montesinos, E. (Eds.) (2010) *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos*. (pp. 340). Madrid: Phytoma-SEF.
- Kadam, S.U., Álvarez, C., Tiwari, B.K. e O'Donnell, C.P. (2015). Extraction of biomolecules from seaweeds. En Tiwari, B.K. & Troy, D.J. (Eds.), *Seaweed sustainability. Food and non-food applications* (pp. 243-269). Elsevier.
- Kim, J., Shin J., Gumilang A., Chung K., Choi K.Y. e Kim, K. (2016). Effectiveness of different classes of fungicides on *Botrytis cinerea* causing gray mold on fruit and vegetables. *The Plant Pathology Journal*, 32, 570-574.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., e Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661, 23-67.
- Llobell, A. (2014). Botrytis ou podredume gris- Plagas e enfermidades da vide. Tomado de <http://misteladeteulada.com/agricultor-cuaderno-de-campo-plagas-y-enfermedades-brotitis-podredumbre/>, 06/06/2017.
- Michalak, I. e Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, 15, 160-176.
- Michalak, I., Tuhy L. e Chojnacka K. (2015). Seaweed extract by microwave assisted extraction as plant growth biostimulant. *Open Chemistry*, 13, 1183-1195.
- Moreira, A.R.S., Garcimartin, A., Bastida, S., Jimenez-Escrig, A., Ruperez, P., Green, B.D., Rafferty, E., Sanchez-Muniz, F.J. e Benedi, J. (2014). Effects of *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata* and *Porphyra umbilicalis* extracts on in vitro alpha-glucosidase activity and glucose diffusion. *Nutricion Hospitalaria*, 29, 1434-1446.
- Padmakumar, K. e Ayyakkannu, K. (1997). Seasonal variation of antibacterial and antifungal activities of the extracts of marine algae from southern coasts of India. *Botánica Marina*, 40, 507–515.
- Patra, J.K., Lee, S.W., Park, J.G. e Baek, K.H. (2017). Antioxidant and antibacterial properties of essential oil extracted from an edible seaweed *Undaria pinnatifida*. *Journal of Food Biochemistry*, 41.
- Pérez, M.J., Falqué, E. e Domínguez, H. (2016). Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Marine Drugs*, 14.
- Rafiquzzaman, S.M., Kim, E.Y., Kim, Y.R., Nam, T.J. e Kong, I.S. (2013). Antioxidant activity of glycoprotein purified from *Undaria pinnatifida* measured by an in vitro digestion model. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 265-272.
- Rajauria, G., Jaiswal, A.K., Abu-Gannam, N. e Gupta, S. (2013). Antimicrobial, antioxidant and free radical-scavenging capacity of brown

- seaweed *Himanthalia elongata* from western coast of Ireland. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 322-335.
- Rangel-Sanchez, G., Castro-Mercado, E. e Garcia-Pineda, E. (2014). Avocado roots treated with salicylic acid produce phenol-2,4-bis (1,1-dimethylethyl), a compound with antifungal activity. *Journal of Plant Physiology*, 171, 189-198.
 - Subramanian, S., Sangha, J.S., Gray, B.A., Singh, R.P., Hiltz, D., Critchley, A.T. e Prithviraj, B. (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*. *European Journal of Plant Pathology*, 131, 237-248.
 - Vera, J., Castro, J., Conzalez, A. e Moenne, A. (2011). Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Marine Drugs*, 9, 2514-2525.
 - Wacquart C., Grulois D., Lamare V. (2012). *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. Tomado de <http://doris.ffesm.fr/Especies/Wakame3>, 18/10/2014.
 - Wakeham, A., Langton, A., Adams, S. e Kennedy, R. (2016). Interface of the environment and occurrence of *Botrytis cinerea* in pre-symptomatic tomato crops. *Crop Protection*, 90, 27-33.
 - Yang, H.J., Lee, J.H., Lee, K.Y. e Song, K.B. (2017). Antimicrobial effect of an *Undaria pinnatifida* composite film containing vanillin against *Escherichia coli* and its application in the packaging of smoked chicken breast. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 398-403.