



FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Grado en Biotecnología

Departamento de Biología y Geología

Área de Microbiología

BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD BIOPESTICIDA FRENTE A *BOTRYTIS CINEREA*

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Universidad de Almería

Junio, 2020

Autora Noelia Esteban Rodríguez

Director José Joaquín Moreno Casco

Codirectora Macarena del Mar Jurado Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Desde que empecé este proyecto, sabía que iba a tener que agradecerles a muchas personas haberme dado la posibilidad de poder realizarlo, lo que no sabía era que esas personas iban a quedar marcadas en mi vida para siempre; las que ya conocía, las que pude conocer más y las que llegaron nuevas.

En primer lugar, quiero dar las GRACIAS a Joaquín, el que un año atrás me dio el sí para poder realizar este Trabajo Fin de Grado en su departamento y sintiera el laboratorio como hogar. Él fue quien me introdujo en este mundo de microorganismos, quien verdaderamente me habló a mis 18 años de lo que era la Microbiología cuando cursaba el primer año de carrera. Recuerdo que en la presentación de su asignatura sentí cierto miedo, pese a que bromeaba, pero se le veía una persona seria y exigente. Este miedo probablemente no se fue haciendo más pequeño hasta que en segundo de carrera volví a cursar una nueva asignatura suya. Estaba delante de una de las personas más sabias que seguramente conoceré, era inevitable que no me sintiera pequeña escuchándole. Gracias por escucharme cuando he ido a tu despacho llena de incertidumbres e intentar siempre darme un empujoncito de ánimo, por tu interés mostrado durante la ejecución del trabajo, por regañarnos cuando ha sido necesario para que fuéramos conscientes de dónde estábamos y qué era lo que estábamos haciendo, y porque eres una persona llena de bondad.

A Macarena, mi codirectora, la que está ahí día sí y día también pendiente de nuestros correos para ayudarnos de forma inmediata. Fuiste un gran referente para mí, cuando te vi tan jovencita y siendo profesora en la Universidad, pensé que quien tiene ganas de verdad y se esfuerza, acaba consiguiendo lo que desea. Gracias por dedicarme tanto tiempo, por hacer que poco a poco la confianza fuera apareciendo y se hiciera más grande, por darme consejos, interesarte por mí en época de exámenes en la que tanto me agobio, por mirar por nosotros como lo haces. No puedo expresarlo tal como lo siento, pero eres una excelente persona, trabajadora, constante y responsable siempre de lo que haces, te admiro de corazón. Me siento muy feliz de haber podido conocerte más y espero que podamos seguir en contacto. Has hecho que mi amor por la Ciencia crezca y me motive a seguir esforzándome por mi futuro.

A Juan y Paqui, y al resto del personal del Área de Microbiología; tanto al resto de profesores del departamento, doctorandos, técnicos, y compañeros que realizaban su TFG aquí. Por hacer que las mañanas y tardes que pasaba en el laboratorio fueran más amenas y eficientes con vuestra presencia y el buen ambiente de trabajo que hay. Ojalá algún día me sienta igual de cómoda en mi puesto de trabajo.

Gracias también a mis amigos de la Universidad, a los que han estado conmigo durante estos 4 años, y he podido conocer más conforme pasaban los años. He tenido momentos muy buenos con ellos, y me han hecho disfrutar de mi etapa universitaria, compartiendo dramas y anécdotas.

A mis amigas de toda la vida, las que permanecen año tras año. Con las que un ratito cada fin de semana me llenaba de energía para la semana. De manera inconsciente me han aportado ganas y motivación durante estos 4 años. Gracias por todas las risas cuando estamos juntas.

Mi familia; mis padres, mi hermana Sandra, mis abuelos, tíos, primas y mi cuñado. Todos ellos son los que han vivido desde fuera con intensidad este proceso, me conocen y saben cómo vivo cada curso académico. Por los que estoy aquí y soy quien soy, mis padres, las personas más trabajadoras y luchadoras que conozco. Siempre se han sacrificado por mí y por mi hermana para darnos lo mejor, inculcándonos valores y hacernos mejores personas día a día. Mi hermana Sandra, mi persona favorita en el mundo, es una guerrera, superviviente, es coraje y fuerza, y es la que se enfrenta a todo lo que se le ponga por delante. Siempre muestra sus ganas e interés por lo que ama. Eres mi ejemplo a seguir Sandra, siempre lo has sido y conforme pasan los años, cada vez me quiero parecer más a ti. A mi ser vivo que no habla y con 4 patas, por hacerme compañía en todos mis días de estudio. Tengo la mejor familia y me siento muy orgullosa de cada uno de ellos.

El pilar fundamental de mi vida se completa con otra persona, Samu, mi pareja. Gracias por llegar para quedarte. Has sido testigo del cariño y esfuerzo que le he dedicado a este proyecto, y has estado apoyándome como el que más, motivándome siempre a amar lo que hago. Pese a que siempre me van a faltar palabras de agradecimiento hacia ti, gracias por todo lo que me demuestras día a día con mínimos detalles, por quererme bien y hacerme feliz.

GRACIAS DE CORAZÓN

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Impacto de la enfermedad del moho gris en la agricultura actual	5
1.2. Métodos de control frente al hongo fitopatógeno <i>Botrytis cinerea</i>	7
1.2.1. Prácticas culturales	7
1.2.2. Control químico	9
1.2.3. Método de fitomejoramiento	10
1.2.4. Control biológico.....	10
<i>Bacillus subtilis</i> como potencial agente biofungicida	13
1.3. Objetivos	16
1.3.1. Objetivo general.....	16
1.3.2. Objetivos específicos.....	16
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
2.1. Diseño experimental	17
2.2. Medios de cultivo	19
2.3. Microorganismos empleados en el trabajo	21
2.3.1. Colección de cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	21
2.3.2. Hongo fitopatógeno: <i>Botrytis cinerea</i>	23
2.4. Ensayos de enfrentamiento dual frente a <i>Botrytis cinerea</i> : cultivo celular y extracto acelular	24
2.4.1. Enfrentamiento dual cultivos celulares.....	24
2.4.2. Enfrentamiento dual extractos acelulares	25
2.4.3. Cuantificación de la inhibición a partir de extractos acelulares en microplacas	26
2.5. Evaluación de la capacidad antagonista de las cepas seleccionadas sobre hoja de cultivo susceptible: ensayo <i>in vitro</i>	27
2.6. Análisis estadístico	29
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1. Efecto antagonista de las cepas de <i>Bacillus subtilis</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> : incidencia directa o indirecta	29
3.1.1. Enfrentamiento dual cultivos celulares.....	29
3.1.2. Enfrentamiento dual extractos acelulares	31
3.1.3. Cuantificación de la inhibición a partir de extractos acelulares en microplacas	34
3.2. Evolución del desarrollo de la enfermedad del moho gris en hojas infectadas con <i>Botrytis cinerea</i> : diferencias tras la aplicación de tratamientos preventivos	34
4. CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

RESUMEN

Botrytis cinerea es un patógeno capaz de atacar a su hospedador empleando sus estrategias de ataque de múltiples formas, y, cuando se dan las condiciones favorecedoras de la infección, se ponen de manifiesto síntomas que producen grandes pérdidas en los cultivos, como ocurre en la enfermedad de la podredumbre gris u oídio.

En este proyecto se realizó un cribado de microorganismos capaces de inhibir el crecimiento del fitopatógeno y así suprimir la enfermedad. Para ello, se emplearon 34 cepas de una colección de *Bacillus subtilis* con el fin de evaluar su capacidad antagonista frente a *B. cinerea*, ya que esta bacteria produce moléculas bioactivas capaces de combatir el oídio. El potencial de cada una de las cepas fue evaluado mediante diversos ensayos. Se seleccionaron las cepas que mostraron mayor capacidad antifúngica mediante enfrentamientos duales en placa entre una alícuota de cultivo celular de la bacteria antagonista y el hongo, y entre una alícuota de extracto acelular y el hongo, y, además, se realizó un enfrentamiento en microplaca con pocillos entre la alícuota de cultivo del fitopatógeno y extracto acelular de *B. subtilis*. Tras esto, en condiciones controladas de laboratorio, se aplicaron cultivos celulares y extractos acelulares sobre hojas de pepino infectadas por el fitopatógeno como medida preventiva, evaluando los daños de manera cualitativa.

Los resultados mostraron que la mayoría de las cepas seleccionadas presentaron una incidencia directa, es decir, cuando el enfrentamiento se producía entre el hongo y la alícuota de cultivo celular de la bacteria antagonista, siendo el porcentaje de inhibición del crecimiento del agente fitopatógeno mayor. Sin embargo, resultó interesante la capacidad de determinados extractos para frenar la enfermedad. En definitiva, *Bacillus subtilis* es un potente agente de control biológico (ACB) con capacidad biopesticida frente a la enfermedad de oídio.

PALABRAS CLAVE: *Bacillus subtilis*, *Botrytis cinerea*, cultivo celular, extracto filtrado, agente de control biológico.

ABSTRACT

Botrytis cinerea is a pathogen capable of attacking its host using its attack strategies in multiple ways, and, when favorable conditions for infections occur, symptoms that produce large losses in crops are revealed, as happens in the disease of gray rot or powdery mildew.

The aim of this project was to screen from a collection of *Bacillus subtilis* the microorganisms that were capable to inhibit the growth of the plant pathogen and suppress the disease. For this, 34 strains were used to evaluate their antagonistic capacity against *B. cinerea*, since these microorganisms produce bioactive molecules capable of fighting powdery mildew. The potential of each of the strains was evaluated through various tests. The strains showing the highest antifungal capacity were selected by means of dual plaque assays between an aliquot of cell culture of the antagonistic bacteria and the fungus, and between an aliquot of acellular extract and the fungus, and, in addition, a microplate confrontation with wells between the culture aliquot of the phytopathogen and acellular extract of *B. subtilis*. After this, in controlled laboratory conditions, cell cultures and acellular extracts were applied to cucumber leaves that were later infected by the plant pathogen as a preventive measure, evaluating the damage in a qualitative way.

The results showed that most of the selected strains had a direct incidence. When the confrontation occurred between the fungus and the aliquot of cell culture of the antagonistic bacteria, being the percentage of the phytopathogen growth inhibition greater. However, the efficacy to stop the disease by some extract was remarkable. Definitely, *Bacillus subtilis* is a powerful biological control agent (BCA) with biopesticidal capability against powdery mildew disease.

KEY WORDS: *Bacillus subtilis*, *Botrytis cinerea*, cell culture, acellular extract, biological control agent.

1. INTRODUCCIÓN

Botrytis cinerea es un hongo presente en una gran variedad de especies vegetales (especialmente fanerógamas) donde actúa causando infecciones en los hospedadores afectados. El nombre de esta especie deriva del griego ‘*botrys*’, que significa racimo de uvas, y del latín ‘*cinerea*,’ que hace referencia al aspecto de ceniza que origina el hongo (Martínez-Bracero, 2019) (Figura 1). Por esa razón, también se le llama “moho gris” u “hongo de la podredumbre gris”.



Figura 1. Síntomas de la infección por el hongo necrotrofo *Botrytis cinerea* en fresa (Williamson et al., 2007).

Atendiendo a su taxonomía, se puede clasificar en las categorías que se muestran en la siguiente tabla (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea* (Williamson et al., 2007).

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycotina
Clase	Leotiomycetes
Orden	Helotiales
Familia	Sclerotiniaceae
Género	<i>Botryotinia</i>
Especie	<i>Botrytis cinerea</i>

Este fitopatógeno se manifiesta por una serie de síntomas que no pueden agruparse solamente en los más típicos, como son la aparición de masas grises sobre las hojas y frutos blandos o podredumbres suaves que vienen acompañadas de un colapso, sino que, en frutos como la baya de grosella negra, la infección por *B. cinerea* no deja síntomas tan característicos, manifestándose en este caso por la abscisión prematura del fruto en desarrollo. En otros, se muestra por la aparición de una lesión marrón en lugar del representativo moho gris. Los

síntomas pueden darse en diferentes momentos y zonas del desarrollo del fruto. Por ejemplo, en los de piel gruesa la incidencia del fitopatógeno se percibe una vez cortados y, además, dependiendo de las condiciones ambientales existentes, la enfermedad provocada por *B. cinerea* puede verse agravada en mayor o menor medida (Williamson et al., 2007).

En cuanto a su ciclo biológico, durante el período invernal el hongo se mantiene en forma de esclerocios, lo cual supone un mecanismo efectivo de supervivencia para *B. cinerea* (Williamson et al., 2007), ya que estas estructuras permanecen protegidas de fenómenos como la radiación ultravioleta (UV) y la desecación, debido al contenido en β -glucanos y a la corteza melanizada (Backhouse y Willets, 1984).

Con el comienzo de la primavera y el aumento de la temperatura, aparecen los conidióforos. Los conidios que se han producido pueden ser la fuente primaria de inóculo en un cultivo (Williamson et al., 2007), aunque cabe destacar que otras estructuras, como las semillas, han sido descritas en diversos estudios como vehículo de propagación de infección por *Botrytis* en hospedadores como el garbanzo, la lechuga, el girasol y el lino, pudiendo ocasionar la pérdida total de los cultivos (Maude, 1980). Continuando con las esporas asexuales, es relevante destacar que su formación se ve favorecida a determinadas longitudes de onda (Epton y Richmond, 1980). La humedad relativa (HR) también es un factor muy importante para que se produzca la germinación conidial en ausencia de agua. En períodos de floración, la HR hace que tengan lugar ciclos de infección y esporulación (Williamson et al., 1995). Los conidios pueden entrar en los tejidos vegetales de manera directa o a través de heridas que faciliten la penetración. Una vez que los conidios germinan, se produce el micelio. En los primeros días, es de aspecto translúcido, y a los 3-5 días adquiere una coloración gris, de ahí que la enfermedad reciba el nombre de “podredumbre gris” (Martínez-Bracero, 2019).

En el ciclo sexual también se producen los apotecios y ascas con 8 esporas binucleadas. Los detalles celulares del inicio de la apotecia aún se desconocen (Williamson et al., 2007), ya que la aparición de estas estructuras se produce de manera ocasional (Beever y Weeds, 2004).

En la Figura 2 se muestra la interacción del ciclo de vida sexual y asexual del hongo fitopatógeno *B. cinerea* en función de su relación con el hospedador durante la infección.

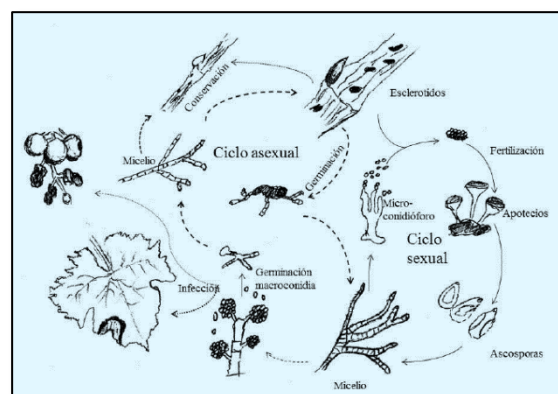


Figura 2. Ciclo de vida de *Botrytis cinerea* (Martínez-Bracero, 2019).

La estrategia de ataque que emplea es necrotrófica. Consiste principalmente en la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular y/o toxinas para provocar la muerte del tejido vegetal y, sólo entonces, obtener nutrientes de la planta que hospedan. El tejido en el que se produce la infección se oscurece y ablanda por la muerte de las células vegetales y, una vez transcurrido un período de tiempo suficiente, sobre las zonas oscurecidas aparece una capa de moho gris debida al crecimiento micelial del fitopatógeno (Benito et al., 2000). Antes de penetrar en el tejido del hospedador, se encuentra con barreras estructurales (preexistentes) tipo ceras o tricomas que debe superar rompiéndolas mediante la secreción de enzimas líticas como lipasas o cutinasas (Van Kan, 2006). Cuando se forma el apresorio, entra agua, ya que el potencial osmótico disminuye, y se rompe el tejido por la presión ejercida. Esto se ve acompañado de la secreción de enzimas que favorecen también la rotura del tejido (Rey-Casal, 2014). Una vez, que el patógeno ya ha penetrado en el hospedador, se produce una lesión primaria, la cual se va expandiendo, seguida de la maceración del tejido que da lugar a los síntomas característicos de la enfermedad de la podredumbre gris (Van Kan, 2006). En la Figura 3 se resumen, de manera esquemática, las etapas de desarrollo del hongo fitopatógeno durante su evolución sobre la planta hospedadora.

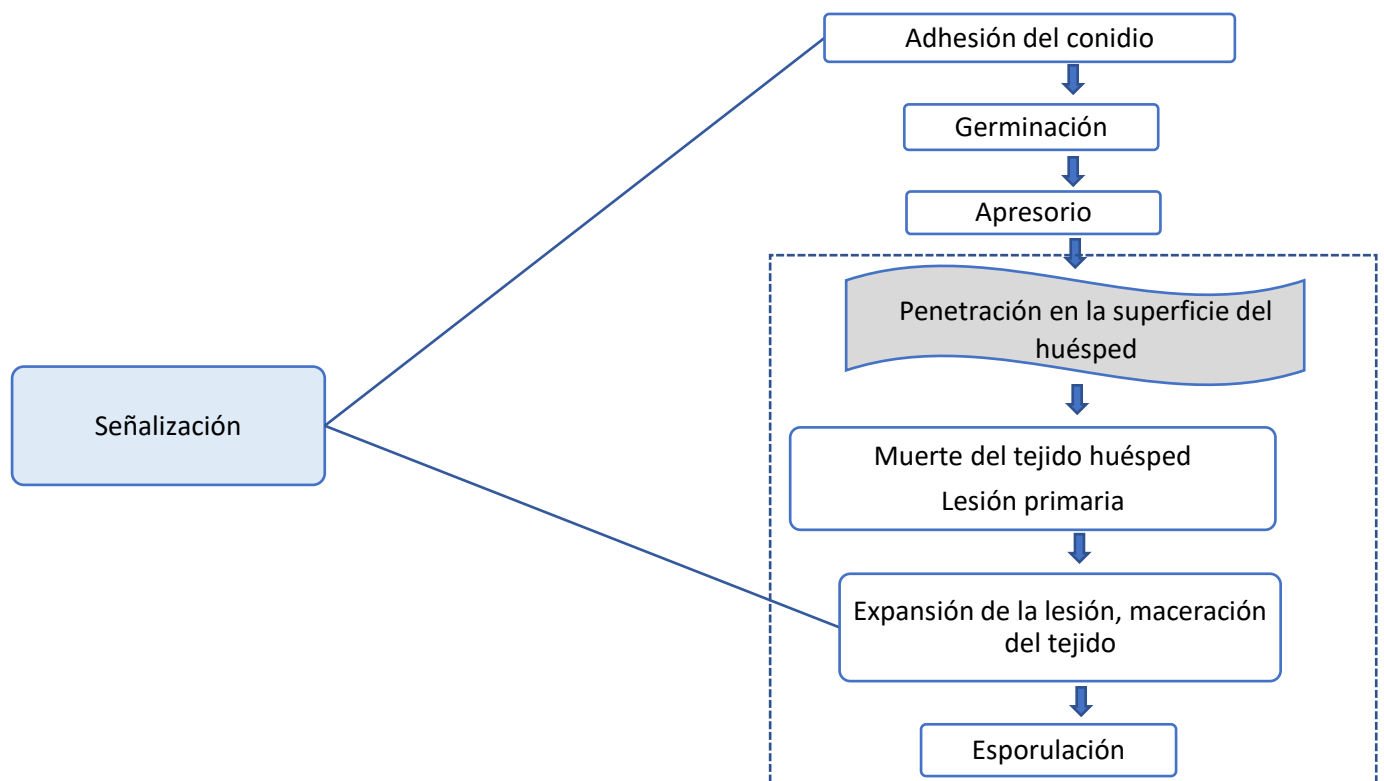


Figura 3. Etapas de desarrollo durante la infección producida por *Botrytis cinerea* (Van Kan, 2006).

1.1. Impacto de la enfermedad del moho gris en la agricultura actual

El “hongo de la podredumbre gris” es uno de los fitopatógenos que mayor impacto tiene en los sistemas agrícolas, ya que afecta a varios tipos de cultivos, especialmente al tomate (*Solanum lycopersicum*), a diferentes clases de frutos rojos, como las fresas (*Fragaria*) o las frambuesas (*Rubus idaeus*), y a las uvas (*Vitis vinifera*). Además, en la actualidad, la mayor parte de las pérdidas que se producen posteriormente a la recogida del cultivo, durante la etapa de postcosecha de frutas y verduras, se asocian también a infecciones producidas por hongos como *B. cinerea* (Droby y Lichter, 2007). Esto implica importantes pérdidas económicas, ya que se trata de cultivos con una producción muy extendida a nivel global.

El fitopatógeno produce la enfermedad cuando se dan las condiciones adecuadas de humedad relativa, temperatura y, por tanto, la fenología del cultivo se ve alterada, siendo las principales fuentes de propagación los conidios y los restos vegetales infectados, incluyendo semillas, que son dispersados por agentes físicos como el viento o la lluvia (Benito et al., 2000).

B. cinerea es un hongo que presenta una alta incidencia en España. De hecho, ha sido, y continúa siendo, objeto de estudio por parte de multitud de grupos de investigación, ya que su incidencia afecta tanto a la viabilidad como a la economía de los cultivos de diferentes regiones del país, como es el caso de Almería, provincia en la que se ubica el llamado “Mar de plástico” por la acumulación de invernaderos. Debido a la enorme importancia de la agricultura intensiva en Almería, el manejo de las plagas y enfermedades ocasionadas por agentes fitopatógenos en los invernaderos de la provincia es fundamental para el establecimiento de sistemas agrícolas de calidad (Tabla 2).

Tabla 2. Plagas y/o enfermedades de mayor incidencia en los invernaderos de la provincia de Almería en relación con los cultivos más representativos (Plan del sector hortícola de Almería, 2002).

Cultivo	Plaga o enfermedad
Tomate	Mosca blanca, Araña roja, Trips, Oidio, <i>Botrytis</i> , Virus TYLCV (Virus del rizado amarillo del tomate)
Pimiento	Trips, Oidio, <i>Botrytis</i>
Berenjena	Trips, <i>Botrytis</i>
Pepino	<i>Botrytis</i> , <i>Sclerotinia</i> , Virus CVYV (Virus de las venas amarillas del pepino), Virus del amarilleo
Calabacín	<i>Botrytis</i> , Podredumbre blanda
Judía	Mosca blanca, Virus TYLCV (Virus del rizado amarillo del tomate)

El control de estas plagas y enfermedades es básico para la obtención de buenos rendimientos en los cultivos. Factores como el clima, la alta densidad de plantación o la higiene inadecuada dentro de los invernaderos y alrededores, contribuyen a que la incidencia de enfermedades causadas por patógenos aumente. Para combatir estas plagas, la sanidad vegetal

ha ido cambiando de forma paulatina. Se han ido introduciendo métodos para proteger a los cultivos, siendo los insecticidas y pesticidas los que han experimentado un fuerte incremento. No obstante, mediante el Registro Oficial de Productos y Material Fitosanitario, actualizado constantemente con los datos procedentes del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, se intenta limitar el uso de los productos a determinados cultivos. En Almería, tanto en el Campo de Dalías como en el de Níjar y Bajo Andarax, a la hora de decidir los tratamientos a aplicar a los cultivos se requiere de asesoramiento técnico (Plan del sector hortícola de Almería, 2002). Precisamente, los invernaderos de la zona de poniente de la provincia (Campo de Dalías) han sido objeto de estudio debido al fitopatógeno *B. cinerea*, ya que el moho gris ha causado graves pérdidas en sus cultivos, poniendo en alerta a todos los factores implicados en los sistemas económicos agrícolas, que demandan investigaciones sobre alternativas de actuación que permitan minimizar dichas pérdidas (Moyano et al., 2003).

1.2. Métodos de control frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*

B. cinerea es un fitopatógeno difícil de controlar, ya que presenta una gran pluralidad de modos de ataque al hospedador (éste también puede ser muy diverso), y tiene la capacidad de sobrevivir largos períodos de tiempo en forma de micelio y/o conidios sobre materia orgánica en descomposición, es decir, cambiando a un modo de vida saprotrofo. No obstante, para el manejo de las enfermedades causadas por el hongo se pueden encontrar diferentes tipos de metodología que incluyen desde el control químico al control biológico, así como prácticas culturales enfocadas en la prevención. Además, como medida alternativa también se puede hacer uso de la técnica de *breeding* o fitomejoramiento para conseguir cultivos que muestren resistencia contra *B. cinerea* (Williamson et al., 2007).

1.2.1. Prácticas culturales

Las denominadas “Prácticas culturales” implican el uso de una serie de medidas de prevención durante el crecimiento de la cosecha y en el período de su recogida para evitar la propagación de enfermedades. Estas medidas, como tales, pueden definirse como “manipulaciones del medio ambiente para mejorar la producción de cultivos”. Conociendo las características del fitopatógeno respecto a su propagación, así como las condiciones ambientales que más le favorecen para ello, se pueden adoptar las medidas más oportunas según cada caso. Por lo tanto, se puede lograr una reducción de los daños en los cultivos afectados por la enfermedad del moho gris cuando se tiene un buen pronóstico tanto de las características del agente causante de la enfermedad como de los datos meteorológicos y las condiciones del sistema de cultivo que pueden afectar en mayor o menor medida.

Por ejemplo, se ha comprobado que el desarrollo de la enfermedad provocada por “el moho gris” se agrava en condiciones de luz reducida, humedad relativa elevada, que promueve

la generación de conidios, y temperatura inadecuada (muy superior o inferior a 25-30 °C). Por lo tanto, una práctica cultural que resulta beneficiosa consiste en mantener un entorno en el que exista una correcta aireación e intercepción de la luz, sobre todo si se trata de cultivos bajo invernadero (Williamson et al., 2007).

Aunque aparentemente pudiera parecer que el cultivo bajo plástico presenta mayores problemas de aireación que favorecen el desarrollo del patógeno, se ha observado que en el cultivo de frutos blandos (como *Fragaria*) bajo las condiciones de invernadero se reduce hasta un 90% la presencia de enfermedades, respecto a cultivos en campo, al aire libre (Xiao et al., 2001). De todos modos, a pesar de que se haya obtenido este elevado porcentaje de reducción tras el cambio de sistema de producción, la ventilación resulta fundamental para optimizar el porcentaje de humedad y, con ello, disminuir la incidencia de fitopatógenos, especialmente hongos, sobre los cultivos.

Respecto a la temperatura, ésta afecta sobre todo en cuanto se da la aparición de contrastes muy acusados entre noche y día, especialmente en regiones que presentan bajas temperaturas en invierno. Para ello, en cultivos bajo abrigo se propone aumentar la temperatura de la estancia justo antes del amanecer en invierno, con el fin de disminuir los saltos térmicos con respecto a la temperatura ambiental y así poder controlar al fitopatógeno (Dik y Wubben, 2007).

Otra práctica efectiva pasaría por la colocación de filtros UV en las cubiertas de plástico para reducir las posibles infecciones (Reuveni et al., 1989; Reuveni y Raviv, 1992; West et al., 2000), así como por adoptar medidas culturales que pasen por la eliminación de cultivos adyacentes muertos y/o materia orgánica en descomposición que puedan actuar como reservorio del patógeno.

Algunas de las medidas culturales más importantes se deben tomar en el momento de la recogida del fruto. Por ejemplo, en el caso de frutos partenocárpicos como el pepino (*Cucumis sativus*) se sabe que la infección por *Botrytis cinerea* comienza en los pétalos. Entonces, una práctica cultural muy extendida consiste en llevar a cabo la separación de los pétalos, en los frutos, ya que de este modo los frutos (sin pétalos) muestran menos síntomas que el resto (Elad y Yunis, 1993).

Existe además una dependencia entre el desarrollo del fitopatógeno y la edad de la planta, ya que cuanto mayor sea, mayor es la susceptibilidad al fitopatógeno. Entonces, la puesta en marcha de sistemas de cultivo a corto plazo puede resultar de gran importancia para hacer frente a *Botrytis cinerea* (Daugaard, 1999).

La colocación y planificación del espaciado físico también es una práctica cultural de interés, por ejemplo, en el cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) se propuso el establecimiento de un espaciado entre las filas aproximadamente igual o superior a 60 cm, permitiendo incluso intercalar con otros cultivos, lo que dio lugar a un menor porcentaje de enfermedad producida por *Botrytis cinerea* (Tripathi y Rathi, 2000).

1.2.2. Control químico

El control químico puede definirse como el uso de sustancias químicas, de origen natural o sintético, para lograr que las poblaciones de organismos se mantengan a niveles que no ocasionen pérdidas económicas. Los compuestos usados se llaman plaguicidas o pesticidas.

Para el control del fitopatógeno que nos ocupa, los productos químicos que se utilizan se agrupan en cinco categorías (Leroux, 2002): pesticidas que afectan a la respiración; que participan en la osmorregulación; en el ensamblaje de microtúbulos; los inhibidores de la biosíntesis de los esteroides; y los que revierten la toxicidad afectando a los aminoácidos (Rosslénbroich y Stuebler, 2000).

Hace 35 años, comenzó a utilizarse metil benzimidazol carbamato (MBC) y su aceptación fue creciendo con el paso del tiempo, pero después se observó que la aplicación del producto de manera repetida favorecía el desarrollo de resistencia química. Entonces, para mantener los niveles por debajo de los que pueden suponer un riesgo, actualmente se utilizan programas de pulverización mixtos. El problema aparece cuando hay cultivos que necesitan de esta protección durante largos períodos de tiempo. Los fungicidas basados en MBC inhiben la formación de β -tubulina y conllevan un desarrollo rápido de resistencias, al que se suma la capacidad de persistir en el ambiente en forma de residuos peligrosos acumulados. Por todo esto, cada vez se está limitando más su uso (Williamson et al., 2007).

Las dicarboximidas se han utilizado como pesticidas frente al fitopatógeno, aunque su objetivo principal respecto a la actuación sobre el hongo aún no es conocido. Lo que sí se ha comprobado es que muestran actividad frente a los conidios y el micelio en situaciones de estrés osmótico (Faretra y Pollastro, 1991).

Por otra parte, la estrobilurina afecta al control del citocromo b inhibiéndolo y también tiene la ventaja de que es capaz de hacer frente a varias enfermedades. Las anilinoimidazoles son de gran utilidad frente a *B. cinerea* por efecto antagonista de la metionina y otros aminoácidos. Ambos fungicidas pueden inhibir la secreción de enzimas hidrolíticas (por ejemplo, cutinasas, lipasas, proteasas y celulasas) que sean capaces de producir patogénesis (Miura et al., 1994). El fungicida más reciente que se conoce es fenhexamida, que se encarga de inhibir la biosíntesis de esteroides (Rosslénbroich y Stuebler, 2000).

En la cereza (*Prunus avium* L.), *Botrytis cinerea* tiene una gran influencia negativa, ya que este fruto tiene una corta vida postcosecha. Entre otros efectos, se deteriora rápidamente y se induce la senescencia, así como se produce la pérdida de agua del fruto y ablandamiento. Este proceso que ocurre en la cereza no sólo se produce por el ataque de *Botrytis*, también cuando este fruto es infectado por otros patógenos como *Alternaria alternata*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus* sp. En un estudio llevado a cabo en este cultivo, se vio que la fumigación realizada con timol resultaba más efectiva que si se usaba etanol o ácido acético en el control de la enfermedad ocasionada por el moho gris. Sin embargo, se sabe que esta sustancia proporciona un olor característico, reduce el contenido en sólidos solubles totales e

incrementa la acidez. Entonces, esto sugiere que, para utilizarlo en fumigación, se debería hacer a bajas dosis (Chu et al., 1999).

Por otra parte, en el cultivo de granada (*Punica granatum*), se utiliza el fungicida fludioxonil. La aplicación de este producto ha hecho que se reduzcan notablemente las pérdidas en los cultivos de granado que sufren debido a la enfermedad producida por *Botrytis cinerea* (Palou et al., 2006).

Aunque haya sido la principal estrategia utilizada en el manejo de enfermedades, incluyendo el período de postcosecha, no todo es bueno en lo que respecta a este método de control, ya que la excesiva dependencia de los pesticidas induce al desarrollo de resistencia química en plagas de insectos y patógenos, de hecho, puede darse la posibilidad de que se dé un resurgimiento de plagas. Además, el uso de estos productos químicos se ha asociado a toxicidad en plantas, animales y, en definitiva, a la aparición de contaminación ambiental (Chen et al., 2018). Por estos motivos, se está haciendo un gran esfuerzo para reducir el uso de pesticidas químicos y utilizar otras alternativas.

1.2.3. Método de fitomejoramiento

Actualmente, se está produciendo un avance considerable en la técnica *breeding*, esto es, la mejora de la herencia en plantas (obtención de progenies con características económicas, ambientales y nutricionales únicas) mediante técnicas de hibridación (Sleper y Poehlman, 2006), para la resistencia al moho gris en tomate (*Solanum lycopersicum*). También se han utilizado especies cercanas como *S. habrochaites* para introgresar la resistencia al moho gris en *S. lycopersicum* (Guimarães et al., 2004).

1.2.4. Control biológico

El control biológico consiste en el uso de organismos vivos para controlar poblaciones de otros organismos. Es un método de control de plagas y fitopatógenos.

Este tipo de control presenta una serie de ventajas, entre las que cabe citar que no se producen efectos colaterales a otros organismos, el desarrollo de resistencia es considerablemente menor que en el control químico, la relación existente entre los costes y beneficios es mayor y, por supuesto, no dejan residuos en cultivos, por lo tanto, no producen problemas de toxicidad (Chen et al., 2018).

Los principales métodos que se conocen para la aplicación del control biológico son (Figura 4):

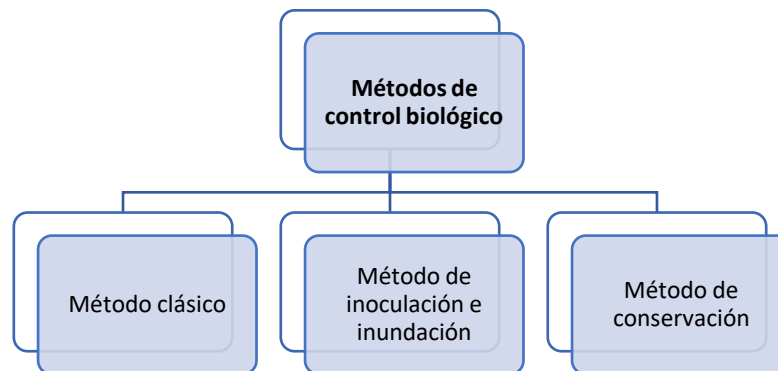


Figura 4. Esquema de los métodos de control biológico.

- **Método clásico:** se introduce un organismo considerado “enemigo” natural de otro que causa una plaga o enfermedad y que ha sido introducido en un nuevo ambiente donde dichos enemigos no se encuentran naturalmente (Van Lenteren et al., 2003).
- **Método de inoculación e inundación:** en este caso, se introducen organismos con el objetivo de que actúen de manera rápida y eficiente, bien comenzando con cantidades pequeñas de forma periódica, inoculación, o bien introduciendo directamente una gran cantidad, inundación, para llevar a cabo el control de la enfermedad a largo plazo, pero que se erradique a corto (Pak, 1988; Van Lenteren et al., 2003).
- **Método de conservación:** es un método que se usa para mantener y fomentar la aparición de “enemigos naturales” ya presentes. Se lleva a cabo modificando el ambiente para adecuarlo al crecimiento de los organismos empleados como agentes de control (Pak, 1998).

Los primeros estudios que se realizaron en la ecología microbiana demostraron que los considerados como antagonistas microbianos presentaban un enorme potencial como agentes para el control de *B. cinerea* en cultivos (Williamson et al., 2007).

Los agentes de control biológico (ACB) se autodispersan en el cultivo y se dirigen a las “zonas objetivo”, diferentes en función de la interacción planta-microorganismo, donde desarrollan modos biológicos de acción concretos. Entre los ACBs se incluyen hongos filamentosos como son *Trichoderma harzianum*, *Clonostachys rosea* y *Ulodadium oudemansii*; bacterias como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae* y *Streptomyces griseoviridis*; y la levadura *Candida oleophila* (Peng et al., 1992). En contraste con los fungicidas, los ACBs actúan en rangos de humedad y temperatura restringidos, pero también están influenciados por fluctuaciones en las poblaciones de microorganismos.

Entre los microorganismos considerados como ACBs destacan los PGPR, denominados así por sus siglas en inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria” (Figura 5). Estos

patógeno. Según Chen et al. (2018), los efectos inhibitorios de las levaduras probadas fueron demostrados *in vitro* usando 918 cepas y basándose en la producción de compuestos volátiles orgánicos (VOCs, de sus siglas en inglés “*Volatile Organic Compounds*”). Los VOCs liberados por los microorganismos son capaces de actuar de manera directa o indirecta activando la inmunidad de la planta y regulando su crecimiento y morfogénesis. En dicho estudio (Chen et al., 2018) se vio que las levaduras antagonistas tenían la capacidad de producir compuestos volátiles, algunas también eran capaces de liberar inhibidores difusibles (antibióticos) y otras, secretaban enzimas hidrolíticas como quitinasas o proteasas. Además, algunas de las cepas con más efectividad *in vitro* fueron evaluadas *in vivo* para comprobar su potencial durante la etapa de postcosecha, mostrando algunas una inhibición del crecimiento del micelio mayor en estas condiciones.

Entre los microorganismos mencionados, destacan especialmente las cepas pertenecientes a la especie *Bacillus subtilis*, debido a su capacidad de producir diversas sustancias de interés (por ejemplo, metabolitos secundarios bioactivos o lipopéptidos cíclicos que exhiben actividades tensioactivas y antimicrobianas fuertes, tales como surfactinas, iturinas y fengicinas), lo que las convierte en potenciales agentes de control de patógenos de plantas (Kaspar et al., 2019). A continuación, se describe esta especie con más detalle.

❖ *Bacillus subtilis* como potencial agente biofungicida

El género *Bacillus* se compone de bacterias con forma de bastón productoras de endosporas que pertenecen al filo Firmicutes (Rooney et al., 2009), en concreto la especie *Bacillus subtilis* se clasifica en las siguientes categorías (Tabla 3):

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis* (NCBI, 2020).

Taxonomía	
Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus subtilis</i>

Bacillus subtilis es una bacteria grampositiva y, por medio de pruebas enzimáticas en relación con el oxígeno, se conoce que es Catalasa-positiva (Kunst et al., 1997). Sobre determinados azúcares actúa por vía fermentativa y se trata de un microorganismo anaerobio facultativo (Earl et al., 2008) (Tabla 4).

Tabla 4. Pruebas enzimáticas en *Bacillus subtilis*. (UAL, 2017a).

	<i>B. subtilis</i>
Gram	+
Esporas	+
Ziehl-Neelsen	-
Catalasa	+
Oxidasa	+/-
Fermentación de azúcares	
Glucosa	+
Lactosa	+/-
Oxido/Fermentación	F
Almidón	+
Gelatina	+
Indol	-
Rojo de Metilo	-
Voges-Proskauer	-
Citratos	+

Es una bacteria que puede encontrarse en ambientes tanto terrestres como acuáticos, lo que informa de su carácter ubicuo, aunque a menudo se le conoce como “habitante del suelo” donde puede sobrevivir durante largos períodos de tiempo. En condiciones en las que exista una limitación de nutrientes o algún tipo de estrés ambiental, este microorganismo es capaz de formar endosporas latentes con una alta resistencia. Estas células especializadas pueden transportarse fácilmente a largas distancias a través del aire, lo cual facilita su dispersión a nuevos ambientes (Earl et al., 2008).

Respecto a su morfología, macroscópicamente (Figura 6a), las colonias de *Bacillus subtilis* alcanzan un diámetro de entre 2-4 mm y pueden ser lisas, rugosas o mucoides. Los bordes de estas pueden aparecer extendidos en la zona media o pueden ser ondulados y, muy ocasionalmente, pueden aparecer como cultivos mixtos. Desde el punto de vista microscópico (Figura 6b), tras una tinción de Gram, se observan bacilos grampositivos formadores de esporas. Éstos tienen un diámetro de aproximadamente 0,8 μm (Realpe et al., 2002).

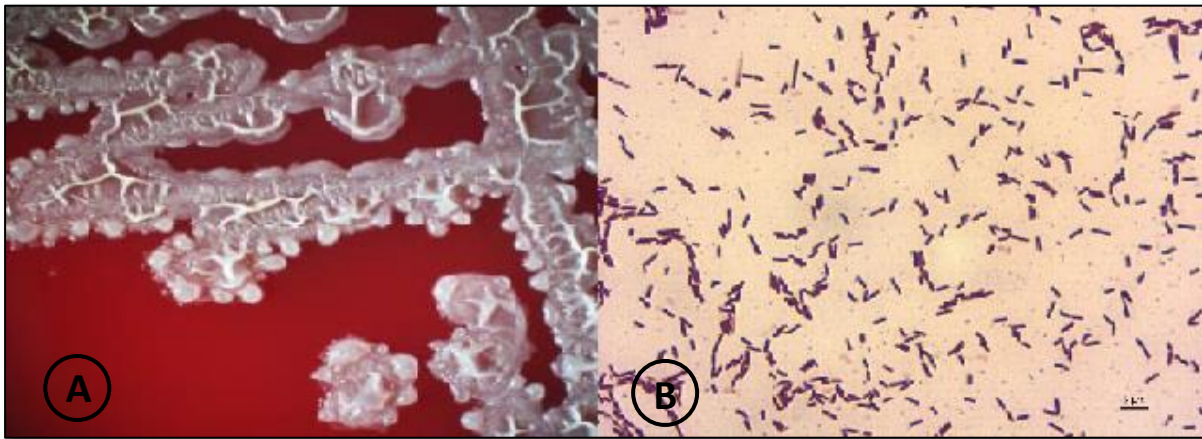


Figura 6. Morfología de *Bacillus subtilis*. Imagen A: morfología macroscópica (Realpe et al., 2002). Imagen B: morfología observada a microscopio óptico (UNICACH, 2014).

Esta bacteria puede usarse como un agente de control biológico. Su potencial reside en la capacidad que presenta para producir moléculas bioactivas frente a enfermedades causadas por bacterias y hongos (Acurio et al., 2018), como es el caso de la enfermedad de oídio producida por un grupo de fitopatógenos entre los que se incluye *Botrytis cinerea* (Asaka y Shoda, 1996; Chen y Wu, 1999; Harris y Adkins, 1999).

B. subtilis es capaz de actuar de forma directa o indirecta. Es decir, puede ejercer la acción directamente, produciendo antibióticos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, o indirectamente, estimulando a la planta para que ésta ponga en marcha sus mecanismos de defensa (Touré et al., 2004).

Touré et al. (2004) estudiaron el efecto de la cepa de *B. subtilis* GA1 en manzanas (*Malus domestica*) que estaban infectadas por *Botrytis cinerea*, para reducir el efecto del fitopatógeno. El tratamiento se hizo con endosporas y células vegetativas de la cepa antagonista. Tras los ensayos *in vitro*, parecía observarse una inhibición del 70% del crecimiento del micelio, debido a la formación de un precipitado blanco asociado a la excreción de compuestos fungitóxicos. Curiosamente, se han encontrado cepas de este microorganismo, por ejemplo *B. subtilis* B-3, en raíces de manzanos enfermos, cuando se pretendía identificar al patógeno causante del daño en cuestión (Pusey, 1988). Algo similar ocurrió en la uva (*Vitis vinifera*) cuando se aisló la cepa KS1 de la epidermis del fruto. Mediante bioensayos se vio que el crecimiento del micelio del fitopatógeno también se veía reducido en presencia de esta bacteria. Esta cepa, además, actuó como antagonista no sólo de *B. cinerea* sino de otros patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* o *Plasmopara viticola*. Destaca asimismo su tolerancia a varios pesticidas químicos y su capacidad de producir el antibiótico iturina A (lipopéptido antifúngico) (Furuya et al., 2011).

Por otra parte, también se ha estudiado la acción de *B. subtilis* en fresa con éxito. Aquí, la cepa seleccionada fue S1-0210. La pre-colonización del hospedador sensible por parte del

agente antagonista puede ser una estrategia a tener en cuenta, ya que previene la infección del hospedador por parte del patógeno fúngico, antes de que se desarrolle la enfermedad hasta un punto irreversible (Hang et al., 2005).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

El uso excesivo de pesticidas, asociado a la intensificación de los sistemas agrícolas, ha dado lugar al desarrollo de resistencias por parte de determinados fitopatógenos, difícilmente controlables. A este grupo de agentes indeseables pertenece el hongo *Botrytis cinerea*, capaz de mermar cosechas enteras de una amplia diversidad de cultivos. La búsqueda de alternativas ambientalmente sostenibles y económicamente viables pasa por el uso de herramientas biotecnológicas, en este caso, basadas en el empleo de microorganismos considerados Agentes de Control Biológico. En este contexto, se plantea el objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado, como la caracterización de la capacidad de una colección de microorganismos, concretamente pertenecientes a la especie *Bacillus subtilis*, aislados a lo largo de distintas etapas de un proceso de compostaje de residuos lignocelulósicos, en base a su potencial antagonista frente a la enfermedad producida por el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

1.3.2. Objetivos específicos

Para poder alcanzar el objetivo general planteado, se consideraron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Seleccionar las cepas de la colección de *Bacillus subtilis* estudiada, en base a su capacidad antifúngica *in vitro* frente a *Botrytis cinerea* como representante de la enfermedad de oídio.
- 2) Verificar si el efecto biopesticida se presenta asociado directamente al cultivo celular o indirectamente al extracto acelular.
- 3) Evaluar la capacidad antagonista de las cepas seleccionadas sobre hojas infectadas con *Botrytis cinerea* como fitopatógeno representante de la enfermedad conocida como "gray mold".

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental

Para lograr los objetivos anteriormente mencionados se llevaron a cabo una serie de experimentos que permitieron la obtención de resultados relevantes en el presente trabajo. En la Figura 7 aparecen representados cronológicamente.

A partir de una colección de 34 cepas correspondientes a la especie *Bacillus subtilis*, se llevó a cabo un cribado inicial para comprobar la potencial capacidad antifúngica del cepario frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (objetivo 1) mediante enfrentamiento dual en placa de Petri.

Las cepas seleccionadas se sometieron a un ensayo en el que se comprobó si la presencia del microorganismo vivo era necesaria para que ocurriese la supresión del agente fitopatógeno (objetivo 2).

En condiciones controladas de laboratorio, se realizó un ensayo directamente sobre material vegetal, en concreto sobre hojas recién cortadas de cultivo de pepino, con el propósito de comprobar su capacidad de supresión como tratamiento preventivo, es decir, antes de la aparición de la enfermedad (objetivo 3).

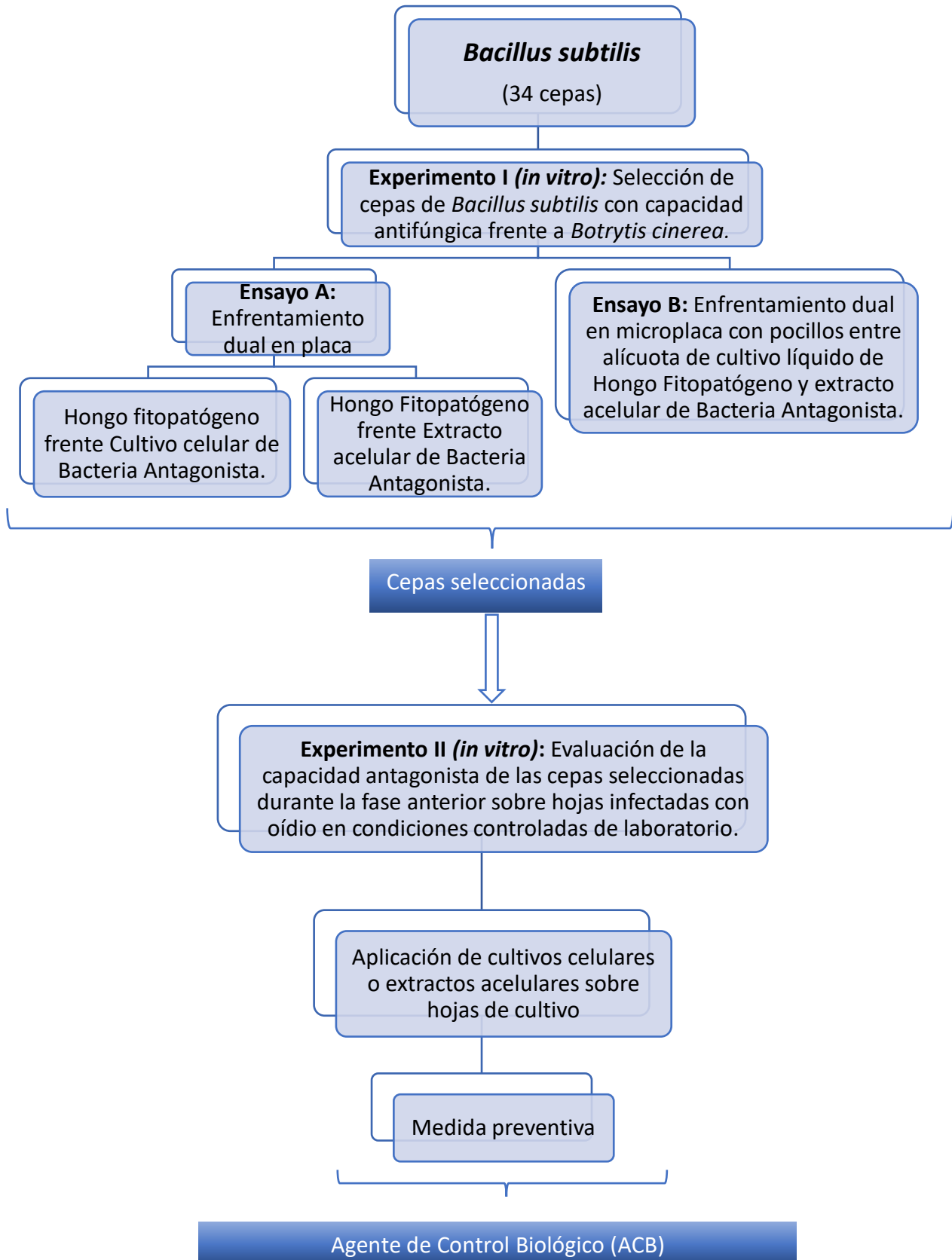


Figura 7. Esquema del Diseño Experimental seguido para la consecución de este estudio.

2.2. Medios de cultivo

Para el mantenimiento de los microorganismos, así como para hacer posible la ejecución de los diferentes ensayos se emplearon diferentes medios de cultivo. A continuación, se reseña la composición de éstos (según la cantidad indicada por el fabricante, ya que se trata de medios comerciales) y los pasos a seguir para su elaboración.

Agar Agua (AA) (PanReac AppliChem):

- Composición (g/L):
Agar bacteriológico..... 20

- Protocolo de preparación:
Se pesaron 20 g de Agar bacteriológico y se añadieron 1000 mL de agua destilada. El contenido se autoclavó durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C. Tras este período de tiempo, se dejó atemperar el matraz para poder distribuir su contenido en placas de Petri.

Agar Dextrosa y Patata (PDA) (PanReac AppliChem):

- Composición (g/L):
Agar bacteriológico..... 15
Dextrosa..... 20
Infusión de Patata (200 g)..... 4
pH: 5,6 ± 0,2

- Protocolo de preparación:
Se realizó una suspensión de 39 g del producto en 1000 mL de agua destilada. Se esterilizó durante 20 minutos a 121 °C. Una vez que el preparado se enfrió a una temperatura adecuada, se vertió en placas de Petri. Este medio se utiliza para el crecimiento de hongos y levaduras.

APHA (PanReac AppliChem):

- Composición (g/L):
Agar bacteriológico..... 15
Digerido enzimático de Caseína..... 5
Extracto de levadura..... 2,5
Anhidro (D+) Glucosa)..... 1
pH: 7,0 ± 0,2

➤ Protocolo de preparación:

Se pesaron 23,5 g del preparado comercial y se le añadieron 5 g de agar bacteriológico, para favorecer la solidificación de los medios en placa. Tras esto, se añadió 1 L de agua destilada, y se llevó a esterilizar en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 120 °C. Una vez transcurrido el tiempo de espera, se dejó enfriar y se distribuyó en placas de Petri.

Caldo de Patata Dextrosado (PDB) (PanReac AppliChem):

➤ Composición (g/L):

Glucosa..... 20

Peptona de Patata..... 4 (equivale a 200 g de infusión de patatas)

pH: 5,6 ± 0,2

➤ Protocolo de preparación:

24 g del preparado comercial fueron pesados en la balanza de laboratorio y se les añadió 1000 mL de agua destilada. La mezcla fue distribuida en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad y se esterilizaron a 120 °C durante 20 minutos.

Caldo Nutritivo (CN) (PanReac AppliChem):

➤ Composición (g/L):

Extracto de carne..... 3

Peptona de Gelatina..... 5

pH: 6,8 ± 0,2

➤ Protocolo de preparación:

Se pesaron 8 g del preparado comercial y se disolvieron en 1000 mL con agua destilada. A continuación, se pasó a un frasco ISO para, con la ayuda de un dispensador, repartir el contenido del medio líquido en cantidades de 5 mL en tubos de ensayo dispuestos en una gradilla metálica. Una vez que todos los tubos fueron cerrados con tapón de celulosa, se llevaron a autoclavar a 121 °C durante 20 minutos.

Rosa de Bengala (PanReac AppliChem):

➤ Composición (g/L):

Agar bacteriológico..... 15

Cloranfenicol..... 0,1

D(+) Glucosa.....	10
Peptona bacteriológica.....	5
Potasio di-Hidrógeno fosfato.....	1
Rosa de bengala.....	0,05
Sulfato magnésico.....	0,5
pH: 7,2 ± 0,2	

➤ Protocolo de preparación:

Se pesaron 32 g del preparado comercial, a los que se le añadieron 1000 mL de agua destilada. Se llevó a esterilizar al autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C. Después, se vertió en placas de Petri.

Solución salina (0,9%):

➤ Composición (g/L):

Cloruro sódico.....	9
---------------------	---

➤ Protocolo de preparación:

En 1 L de agua destilada se disolvieron 9 g de NaCl. Previamente a su esterilización (a las condiciones indicadas anteriormente), el preparado se pasó a frascos ISO.

2.3. Microorganismos empleados en el trabajo

Para la ejecución de la parte experimental de este Trabajo Fin de Grado se utilizaron microorganismos pertenecientes a la especie *Bacillus subtilis*, como potenciales antagonistas, y el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, los cuales se describen con más detalle a continuación.

2.3.1. Colección de cepas de *Bacillus subtilis*

La colección de bacterias estudiada, perteneciente al grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería, contó con 34 cepas identificadas como *Bacillus subtilis*. Las identidades de los aislados se determinaron en base al análisis parcial o casi completo de la secuencia del gen del rRNA 16S.

En la Tabla 5 se recoge información relativa a dichos aislados bacterianos, en concreto, el número de identificación interno (según la clasificación de la colección del grupo de investigación), el porcentaje de identidad y el número de acceso según la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tabla 5. Colección de cepas de *Bacillus subtilis* empleadas.

Código	Identidad	%Identidad (Blast)	Número de Acceso (Blast)
25	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JQ403532.1
691	<i>Bacillus subtilis</i>	98	JQ415986.1
1058	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KF530832.1
1080	<i>Bacillus subtilis</i>	100	JN366756.1
1262	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JX042467.1
1406	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JN366756.1
1518	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JQ518358.1
2000	<i>Bacillus subtilis</i>	96	JX673943.1
2055	<i>Bacillus subtilis</i>	99	GQ305125.1
2155	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JX042467.1
2161	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JN409452.1
2167	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KC438378.1
2265	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KJ124576.1
2309	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KF112078.1
2398	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JQ403532.1
2435	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KC990823.1
2473	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JX403943.1
2475	<i>Bacillus subtilis</i>	98	KC519425.1
2688	<i>Bacillus subtilis</i>	100	JX515571.1
2727	<i>Bacillus subtilis</i>	97	JN363795.1
2764	<i>Bacillus subtilis</i>	99	HQ284926.1
2781	<i>Bacillus subtilis</i>	97	HQ398997.1
2808	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JQ308568.1
2840	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JQ518358.1
2850	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JQ518358.1
2897	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JN366773.1
2908	<i>Bacillus subtilis</i>	99	FJ581439.1
2929	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JQ403532.1
2938	<i>Bacillus subtilis</i>	99	FJ969738.1
2944	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JQ669676.1
3027	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KC813165.1
3497	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JN641293.1
3654	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KC692194.1
3909	<i>Bacillus subtilis</i>	98	KF017548.1

Las 34 cepas, fueron resembradas mediante aislamiento en estrías (Figura 8) para la obtención de cultivos puros frescos, empleando para ello placas de Petri con medio APHA (medio general para el crecimiento de microorganismos) y se incubaron durante un período de tiempo de 48 h a una temperatura de 30 °C, para asegurar el crecimiento preferente de bacterias mesófilas.

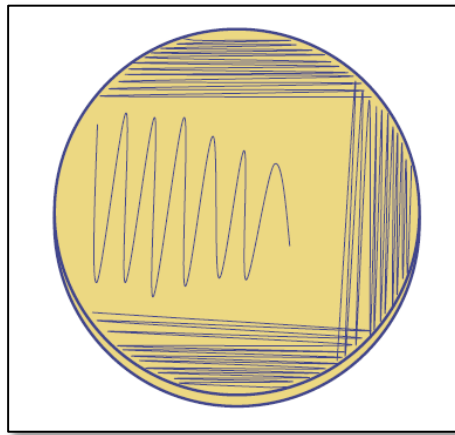


Figura 8. Aislamiento mediante técnica de estriado en placa (UAL, 2017b).

Asimismo, se llevaron a cabo aislamientos periódicos para evitar contaminaciones y realizar labores de mantenimiento en la colección. Para el mantenimiento a medio plazo, se emplearon tubos de agar inclinado (en slant) con medio APHA conservados a temperaturas de refrigeración, en torno a 4 °C. Para obtener cultivos puros es necesario realizar la inoculación a partir de colonias que se encuentren completamente aisladas.

2.3.2. Hongo fitopatógeno: *Botrytis cinerea*

En el presente TFG, *Botrytis cinerea* CECT 20973 fue el fitopatógeno empleado como representante de la enfermedad de oídio.

Para su mantenimiento, la cepa en cuestión se sembró en PDA colocando un plug del fitopatógeno a ensayar en el centro de la placa de Petri con la ayuda del asa de platino o empleando un sacabocados en condiciones de esterilidad. Tras esto, se conservó en la estufa a 25 °C durante 5 días. También se emplearon tubos de agar inclinado (en slant) para el mantenimiento de la cepa.

Para la recuperación de la cepa se hizo uso del medio RB para evitar la presencia de bacterias contaminantes, ya que el medio está adicionado con un antibiótico, cloranfenicol. Del mismo modo que en el caso anterior, se sembró el hongo colocando un plug en el centro de la placa y usando la misma instrumentación. A continuación, se incubó a una temperatura de 25 °C durante unos 5 días.

Los ensayos en los que se utilizó el fitopatógeno fueron el enfrentamiento dual en placa entre el hongo y una alícuota de cultivo celular y extracto acelular de *Bacillus subtilis*, también en el enfrentamiento dual en microplaca entre el extracto acelular de la bacteria y una alícuota de cultivo líquido de hongo. Además, *Botrytis cinerea* se sometió a la evaluación de la capacidad antagonista de *B. subtilis* sobre hojas ya infectadas. Estos ensayos se realizaron *in vitro*. Posteriormente, se detallará cada uno de ellos.

2.4. Ensayos de enfrentamiento dual frente a *Botrytis cinerea*: cultivo celular y extracto acelular

En el primer experimento que se llevó a cabo se realizaron dos ensayos *in vitro* para seleccionar cepas de *Bacillus subtilis* que presentaran capacidad antifúngica frente a *Botrytis cinerea*. A continuación, se explicará la metodología empleada en cada uno de los ensayos, así como el material necesario para efectuarlos.

Uno de los ensayos se realizó mediante dos tipos de enfrentamientos. En primer lugar, se enfrentó el hongo fitopatógeno al cultivo celular de cada bacteria de la colección de estudio y, después, en función de los resultados del primer enfrentamiento, se enfrentó *B. cinerea* a los extractos acelulares provenientes de las cepas seleccionadas.

2.4.1. Enfrentamiento dual cultivos celulares

En ambos, se acondicionaron las placas de enfrentamiento dual del mismo modo. Se preparó el medio Agar Agua (AA) siguiendo el protocolo del apartado 2.2. A continuación, el AA se vertió en capas muy finas sobre placas de Petri, las cuales se dejaron solidificar. Una vez solidificadas, sirviendo de soporte, se colocaron, sobre dicha capa, 4 torrecillas de Oxford (cilindros de acero inoxidable) de manera equidistante con la ayuda de pinzas estériles, teniendo la precaución de no hundirlos en el agar. Para mantener las condiciones de esterilidad, las pinzas se flamearon antes de volver a colocar cada nuevo cilindro, siempre en el entorno del mechero Bunsen. Para el diseño de la placa, se usó la plantilla representada en la Figura 9, quedando situadas las torrecillas sobre los círculos verdes.

Posteriormente, se vertió sobre el AA con los cilindros dispuestos adecuadamente, una capa de PDA a sobrefusión, por fuera de las torrecillas de Oxford. Una vez sólido el medio, se retiraron las torrecillas con la ayuda de pinzas estériles siguiendo las precauciones mencionadas anteriormente para mantener las condiciones de asepsia. De modo que se formaron cuatro pocillos en el lugar que habían ocupado los cilindros de acero.

Para realizar el primer enfrentamiento, utilizando la plantilla de la Figura 9, se colocó un plug del fitopatógeno en el centro de la placa (círculo azul) utilizando un sacabocados estéril. Los pocillos fueron inoculados con 100 μ L de cultivo de cada cepa, utilizando una micropipeta. Esto se realizó con cada una de las cepas de la colección. También se preparó una placa Control, en la que solamente se colocó el plug del hongo. Cada una de las cepas a ensayar fue sembrada en tubos de Caldo Nutritivo (CN), partiendo de 2-3 colonias aisladas de una placa sembrada con estrías. Los tubos se incubaron en agitación durante 48 h y a una temperatura de 30 °C. Una vez que el enfrentamiento estaba preparado, se dejaron incubar las placas durante 5 días a 25 °C (condiciones favorables para el fitopatógeno). La lectura se efectuó midiendo los diámetros de inhibición como se indica en la Figura 10.

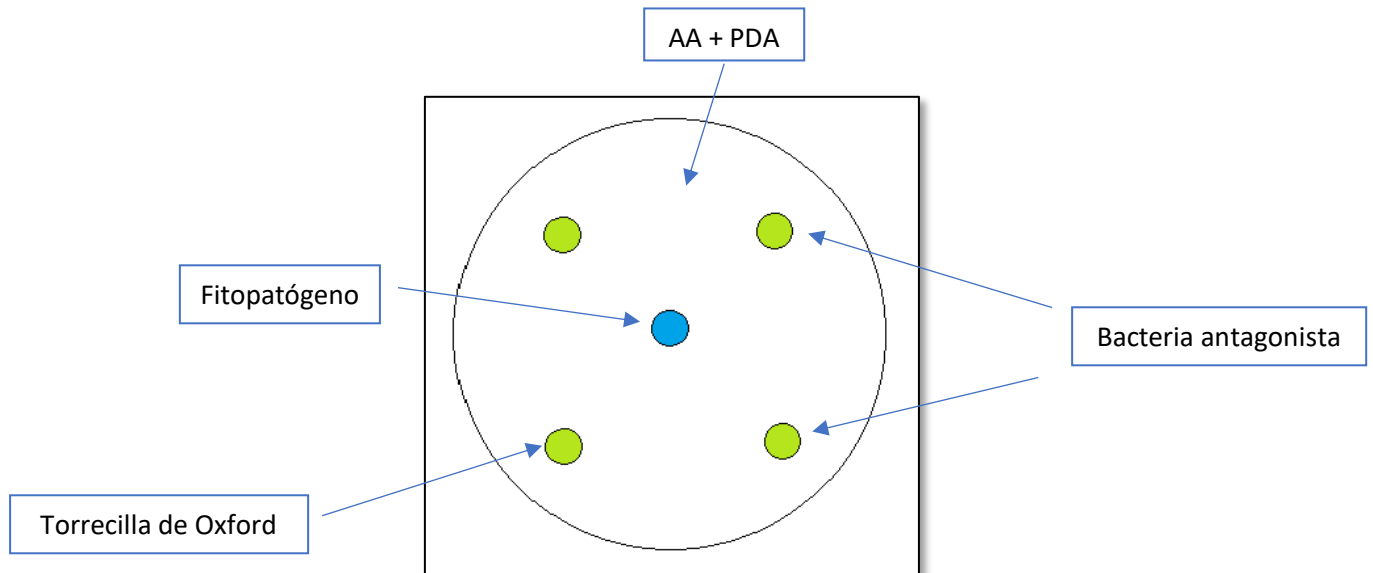
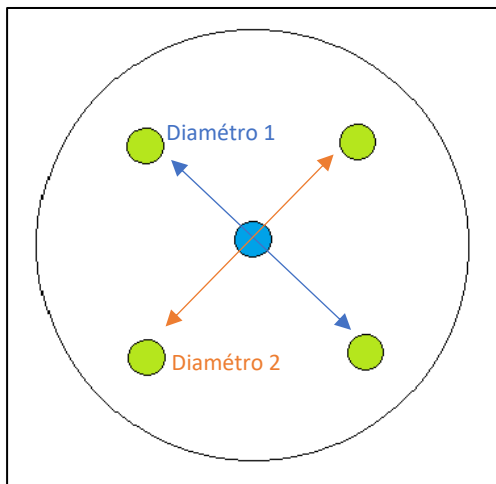


Figura 9. Plantilla de enfrentamiento dual en placa.



Para el cálculo del Índice de inhibición (I) se empleó la siguiente fórmula matemática:

$$I = \frac{(C-T)}{C} \times 100$$

donde

I = índice de inhibición (%)

C = crecimiento del agente fitopatógeno en ausencia de la cepa antagonista (mm). Media de los diámetros de inhibición.

T = crecimiento del agente fitopatógeno en presencia de la cepa antagonista (mm)

Figura 10. Medida del porcentaje de inhibición en el enfrentamiento entre la bacteria antagonista y el hongo fitopatógeno.

2.4.2. Enfrentamiento dual extractos acelulares

El segundo enfrentamiento se realizó del mismo modo que en el caso anterior, pero, en este caso, los pocillos fueron inoculados con extractos acelulares estériles. A partir de los

resultados que se obtuvieron en el primer enfrentamiento, se emplearon las cepas positivas de *Bacillus subtilis* para obtener los extractos acelulares. Para ello, se sembraron las cepas en Caldo Nutritivo (CN) y se incubaron durante dos días a una temperatura de 30 °C en agitación. Tras este período de incubación, se centrifugaron alícuotas de 2 mL en tubos Eppendorf estériles a 10000 rpm durante 5 minutos (Eppendorf™, modelo 5424). A continuación, se filtró un volumen de aproximadamente 500-1000 µL del sobrenadante obtenido tras la centrifugación. Para realizar la filtración, se usaron filtros de jeringa estériles (0,45 µm de diámetro) (Sartorius). El extracto libre de células se depositó en nuevos tubos Eppendorf estériles. Una vez que se disponía del extracto acelular, los pocillos fueron inoculados con 100 µL de éste. Previamente, como en el ensayo anterior, en el centro de la placa se situó un plug de *Botrytis cinerea*. Las placas de enfrentamiento dual se incubaron a 25 °C durante 5 días, para después realizar la lectura correspondiente.

2.4.3. Cuantificación de la inhibición a partir de extractos acelulares en microplacas

Paralelamente, con las cepas seleccionadas en el experimento anterior, se llevó a cabo un ensayo de cuantificación en microplaca con 48 pocillos, en el que se enfrentaron una alícuota de *Botrytis cinerea*, proveniente de cultivo líquido, y extracto acelular de la bacteria. Para llevarlo a cabo, se sembró el hongo en frascos ISO con PDB y se incubó a 25 °C. A continuación, en la microplaca se realizó el enfrentamiento por triplicado. En cada pocillo, se inocularon 150 µL iniciales de medio de cultivo PDB. En los controles negativos, a ese volumen se le adicionaron otros 150 µL de PDB, mientras que a los controles positivos se le adicionaron 150 µL de PDB inoculados con el fitopatógeno. En los pocillos correspondientes a cada cepa, a los 150 µL iniciales se le adicionaron 75 µL de PDB inoculados con *B. cinerea* y otros 75 µL de extracto acelular (ver apartado 2.4.2) de cada cepa. Una vez preparada la microplaca, se cubrió con un adhesivo plástico estéril para dejar sellada la microplaca. Por último, se incubó durante 5 días a 25 °C para posteriormente realizar la lectura de los resultados obtenidos mediante la siembra en Rosa de Bengala (RB) y el ensayo espectrofotométrico con resazurina. La microplaca quedó diseñada como aparece en la Figura 11.

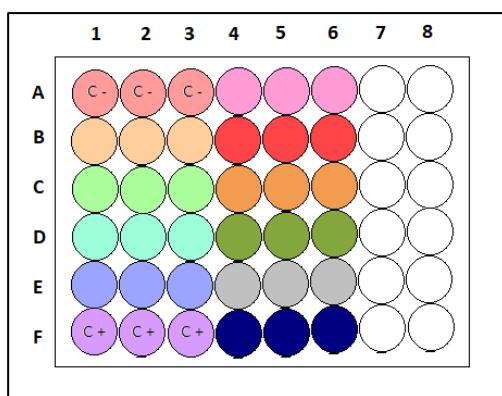


Figura 11. Plantilla microplaca de 48 pocillos para el enfrentamiento del fitopatógeno y extracto acelular de la bacteria.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron diluciones decimales seriadas (desde 10^{-1} hasta 10^{-4}) a partir de cada pocillo, empleando tubos Eppendorf con solución salina estéril al 0,9 %. Una alícuota de 100 μ L de cada dilución se sembró en la superficie de placas de RB con la ayuda de bolitas de vidrio estériles para dispersar el volumen de manera homogénea. Las placas se incubaron a una temperatura de 25 °C durante 5 días.

Para el ensayo espectrofotométrico, se empleó resazurina (previamente mantenida en oscuridad) al 0,01%. Se adicionó un volumen de 50 μ L del colorante a cada pocillo y se incubó la microplaca durante 2 horas a la misma temperatura que la inicial. Tras este período de tiempo, se realizó la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 600 nm (es la máxima longitud de onda para el reactivo oxidado, azul), y a 570 nm (es la máxima longitud de onda para el reactivo reducido, resorufina, rosa) permitiendo detectar la evolución del crecimiento del fitopatógeno en presencia del extracto acelular de la bacteria potencialmente antagonista.

2.5. Evaluación de la capacidad antagonista de las cepas seleccionadas sobre hoja de cultivo susceptible: ensayo *in vitro*

En este segundo bloque experimental, en condiciones controladas de laboratorio, se evaluó la capacidad antagonista de las cepas preseleccionadas sobre hojas infectadas con *B. cinerea*, como representante de la enfermedad de oídio.

Para su desempeño, se aplicó cultivo celular y extracto acelular sobre hojas de pepino susceptibles a la enfermedad. Se llevó a cabo un tratamiento preventivo, es decir, la aplicación se realizó 72 horas antes de la inoculación con el fitopatógeno.

El protocolo que se siguió fue el siguiente: en primer lugar, se sembraron semillas de pepino (*Cucumis sativus*) para disponer de hojas en el momento del inicio del tratamiento. Una vez se dispuso de hojas con un tamaño adecuado para ser manipuladas sobre placas de Petri cuadradas (Gosselin), comenzó el experimento. Para ello, se sembraron las cepas seleccionadas en medio líquido (CN) y se incubaron en agitación a una temperatura de 30 °C, durante 48 h. Para obtener los extractos acelulares se procedió del mismo modo explicado anteriormente (ver “enfrentamiento dual extractos acelulares”). Se prepararon las placas de Petri con papeles de filtro estériles, los cuales fueron humectados con 4 mL de agua destilada estéril. Las hojas se sumergieron en cultivo celular y en extracto acelular, respectivamente, así como en agua por duplicado para las hojas empleadas como control con y sin hongo patógeno. Se realizaron 5 réplicas por cepa en cada condición ensayada, cultivo y extracto. Posteriormente, pasados 3 días desde el tratamiento preventivo con las cepas potencialmente antagonistas, se inocularon las hojas con un plug de *Botrytis cinerea*, salvo aquellas destinadas a ser control negativo de la enfermedad. Las hojas fueron dispuestas mostrando el haz. En la Figura 12, se muestra el desarrollo del procedimiento anteriormente explicado.

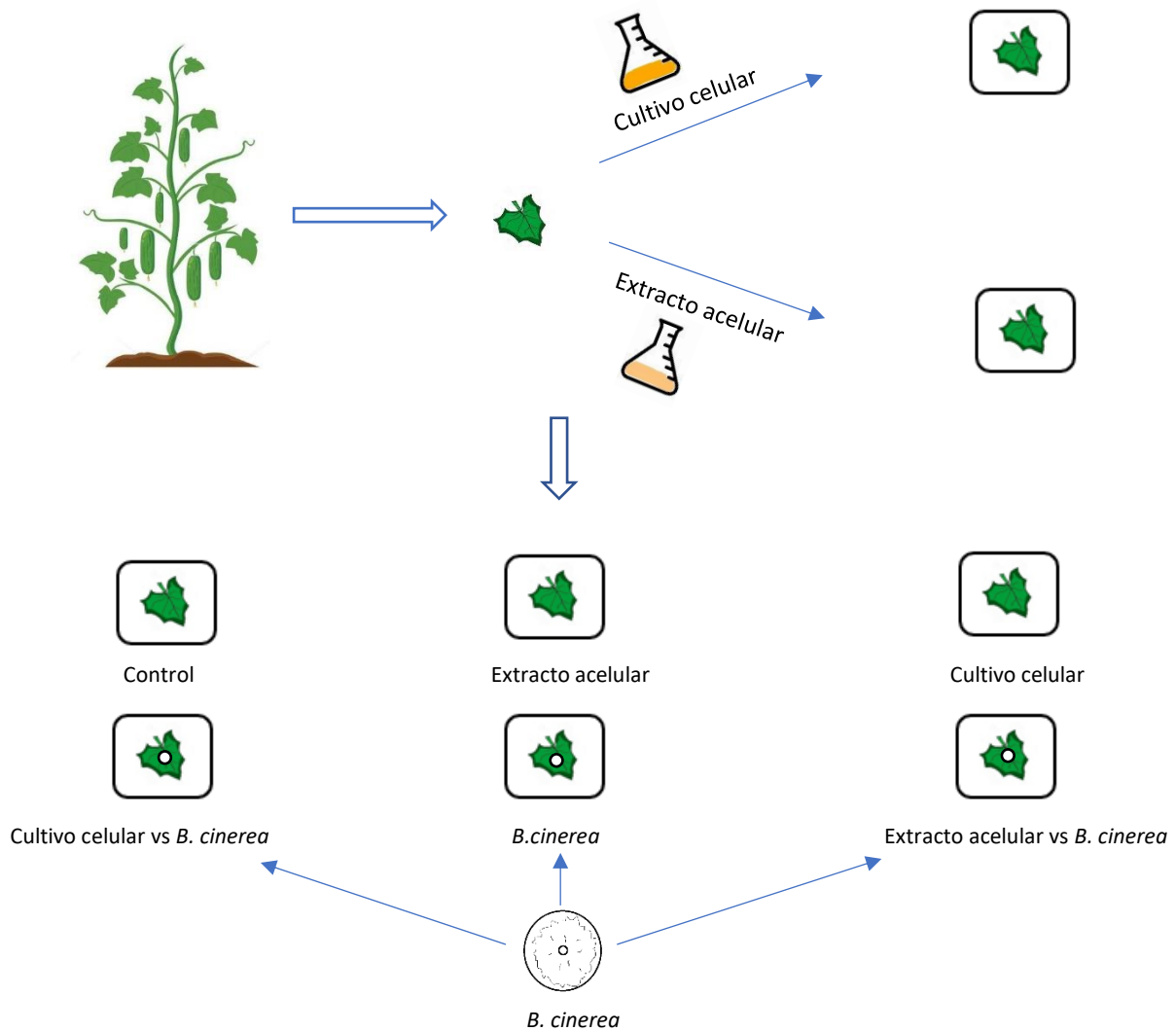
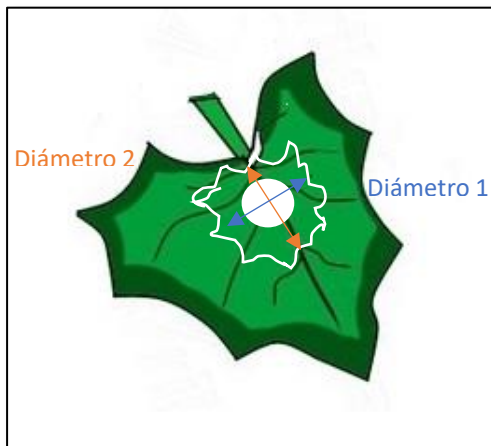


Figura 12. Tratamiento preventivo en hojas de pepino susceptibles al oídio.

Las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días para posteriormente evaluar los daños producidos por el fitopatógeno, asignando un valor numérico a las diferentes posibilidades observadas. La escala fue del 1 al 4, de menor a mayor gravedad de los daños, siendo (1) Hoja sana, (2) Daño leve, (3) Daño severo y (4) Muerte. Asimismo, se midieron los diámetros de crecimiento del hongo sobre la hoja como se indica en la Figura 13.



Se miden ambos diámetros y se realiza la media.

$$\text{Media diámetros} = \frac{D1+D2}{2}$$

Figura 13. Medida del crecimiento de *Botrytis cinerea* sobre hoja de pepino.

2.6. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron procesados mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows, para la obtención de las tablas y gráficas representadas en este trabajo. Además, se realizó un Análisis Factorial de Varianza (ANOVA) con los datos y se compararon las diferencias significativas entre las medias mediante el Test de Mínima Diferencia de Fisher (LSD), utilizando un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$), así como un gráfico de matriz y un análisis de factores, para lo que se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVIII.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los objetivos establecidos y el procedimiento experimental llevado a cabo para alcanzarlos, a continuación, se exponen con detalle los resultados obtenidos en cada caso.

3.1. Efecto antagonista de las cepas de *Bacillus subtilis* frente a *Botrytis cinerea*: incidencia directa o indirecta

3.1.1. Enfrentamiento dual cultivos celulares

A partir del primer enfrentamiento dual en placa, realizado directamente con los cultivos de las 34 cepas de la colección estudiada, se observó cómo el 74% de las bacterias mostró carácter supresivo frente a *Botrytis cinerea*. Además, cabe destacar que, el carácter antagonista mostrado por la mayoría de las cepas efectivas fue fuerte, con porcentajes de inhibición superiores al 50% (Suárez-Estrella et al., 2012). En la Figura 14 se observan los resultados positivos (26 cepas) extraídos del enfrentamiento con cultivos celulares.

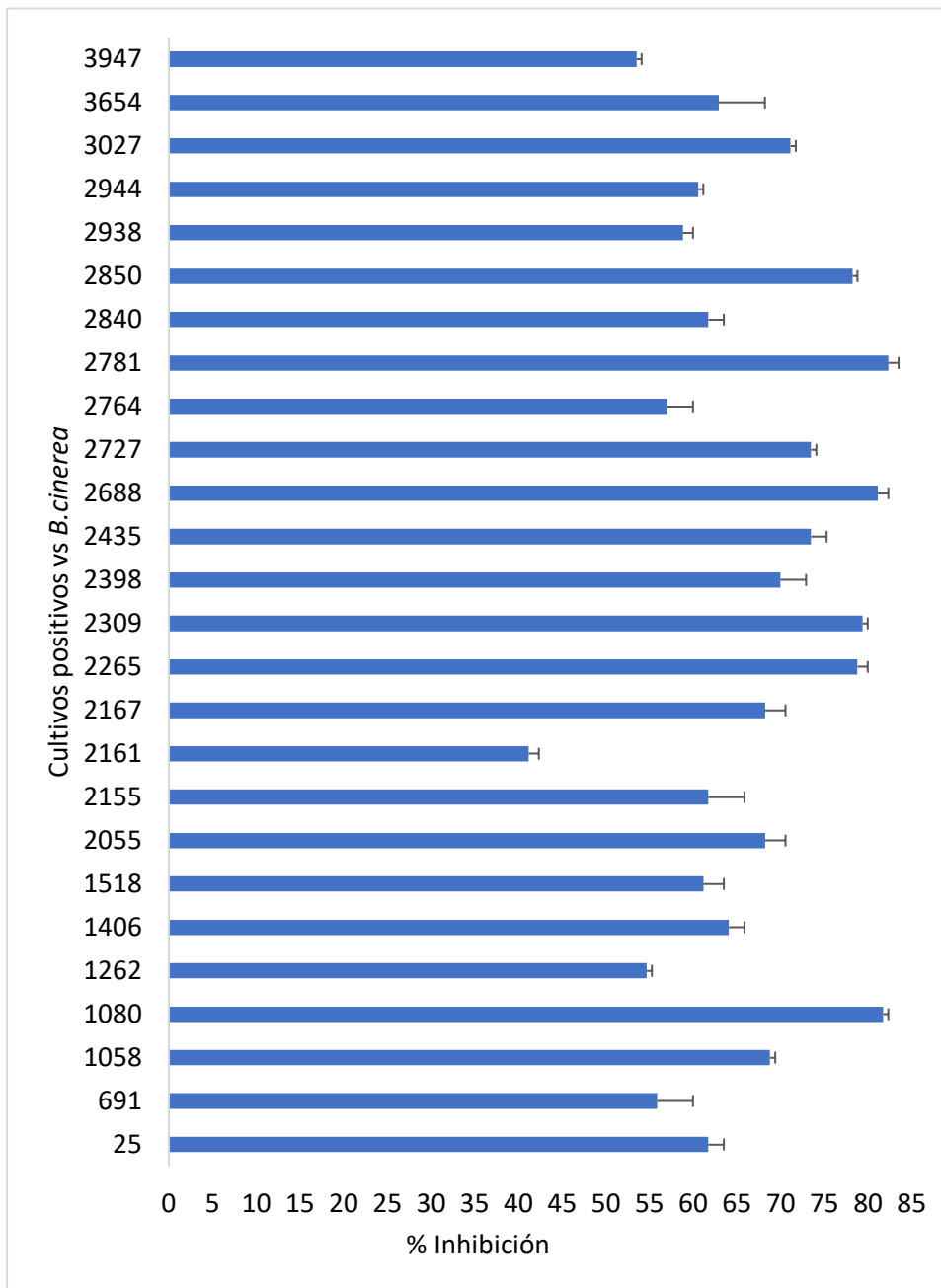


Figura 14. Efecto inhibitorio (%) directo de cultivos celulares *in vitro*.

Las cepas 2781, 1080 y 2688 mostraron porcentajes de inhibición muy elevados siendo estos del 82,35%, 81,76% y 81,18%, respectivamente. Por otro lado, el resultado más bajo lo registró la cepa 2161, que no llegó a alcanzar el 50% (41,18%). Aún así, el porcentaje de éxito frente a *B.cinerea* fue satisfactorio, respecto al número de cepas positivas y al grado de supresividad alcanzado por cada una. Estos resultados concuerdan con otras investigaciones en las que atribuyen a diversas especies del género *Bacillus* la capacidad de producir lipopéptidos. Se trata de moléculas involucradas en procesos tales como la colonización de la planta, la activación de su “sistema inmune”, la inducción de resistencia de la planta frente a

fitopatógenos y el antagonismo directo contra dichos patógenos. En el caso de la especie *B. subtilis*, destacando especialmente la surfactina y la iturina, relacionadas con actividad antifúngica (Bolívar-Anillo et al., 2019).

Esta inhibición del crecimiento del fitopatógeno en presencia de *B. subtilis* pudo observarse, también de manera evidente, visualmente. En las fotografías mostradas en la Figura 15, se aprecian los halos formados durante el enfrentamiento patógeno-antagonista, donde destaca la imposibilidad del hongo para seguir avanzando, conforme se acerca al pocillo que contiene el cultivo bacteriano.

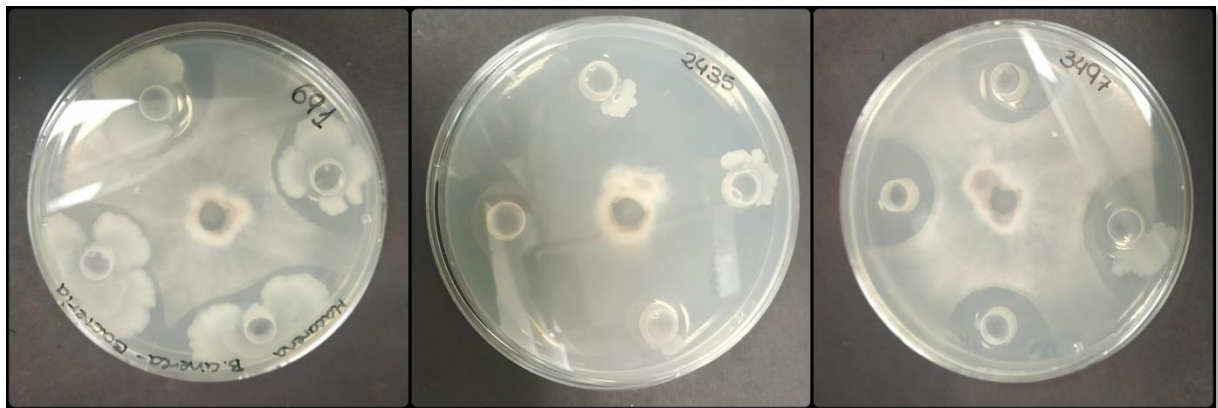


Figura 15. Ejemplos de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea*. De izquierda a derecha, cepas ensayadas: 691 (55,8%); 2435 (73,5%); y 3497 (53,5%).

3.1.2. Enfrentamiento dual extractos acelulares

Todas las cepas con potencial antagonista, seleccionadas por su efecto inhibitor sobre *Botrytis* en el ensayo anterior, fueron probadas en un nuevo experimento, pero esta vez para comprobar la presencia necesaria (o no) del microorganismo vivo para ejercer dicho efecto supresivo hacia el patógeno. Es decir, se llevó a cabo un ensayo dual en placa con extractos acelulares estériles procedentes de las 26 cepas preseleccionadas.

En la Figura 16 se muestran las cepas que resultaron positivas en el ensayo con extracto acelular (8 de las 26 probadas). Igual que en el caso anterior, los extractos de las cepas que funcionaron lo hicieron con un nivel de inhibición considerable (35-65%).

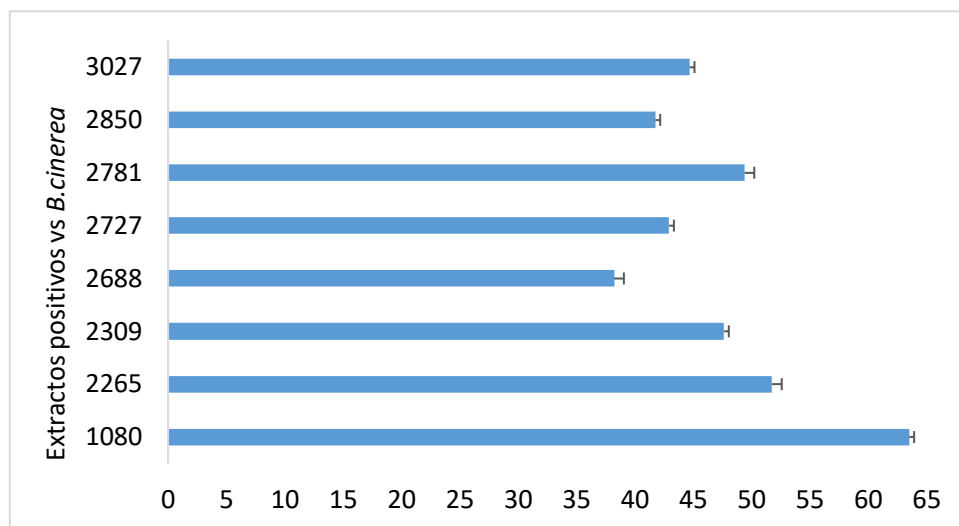


Figura 16. Efecto inhibitorio (%) indirecto de extractos acelulares *in vitro*.

Este ensayo determinó la existencia de 8 cepas susceptibles de ser empleadas como agentes de control biológico tanto mediante su aplicación directa (cultivo celular) como indirecta (extracto acelular). Con el objetivo de hacer un cribado de las cepas más prometedoras, candidatas para el siguiente experimento, se llevó a cabo una comparativa tal y como se muestra en la Figura 17.

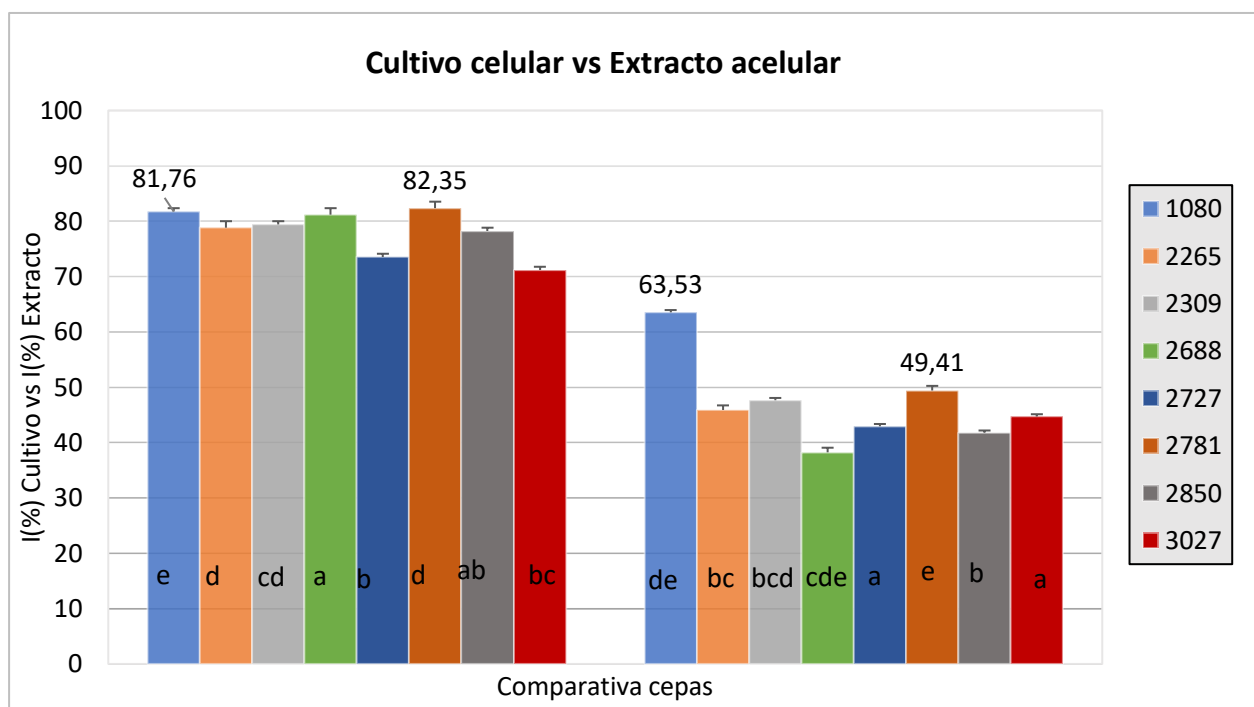


Figura 17. Comparativa de sendos ensayos de inhibición (%) con las cepas positivas empleando el cultivo celular (izquierda) y el extracto acelular (derecha). Distintas letras de homogeneidad corresponden, en cada parámetro, a valores medios significativamente diferentes ($P < 0,05$).

En la Figura 17 se observa como todos los porcentajes de inhibición disminuyeron al enfrentar el hongo a los extractos acelulares de las potenciales bacterias antagonistas. Esto confirmó que el efecto antagonista presentó mayor eficiencia en presencia del microorganismo vivo, para suprimir al fitopatógeno, es decir, la incidencia del fenómeno de antagonismo responde a una estrategia principalmente directa. No obstante, en ocasiones en las que sea conveniente la aplicación de un extracto, algunas de las candidatas recogidas en la Figura 16, podrían ser garantía de éxito. De hecho, la utilización no sólo de cultivos, sino de filtrados de éstos, ha sido empleada previamente para reducir enfermedades fúngicas (Elmer y Reglinsk, 2006; Kim et al, 2013).

Teniendo en cuenta tanto los valores medidos en cada caso, cultivo y extracto, como las diferencias significativas observadas, se escogieron para el ensayo en material vegetal las cepas de *Bacillus subtilis*: 1080 y 2781 (Figura 18). Éstas, presentaron el mayor efecto supresivo en ambas condiciones, destacando con un comportamiento notablemente mejor que el resto de cepas.

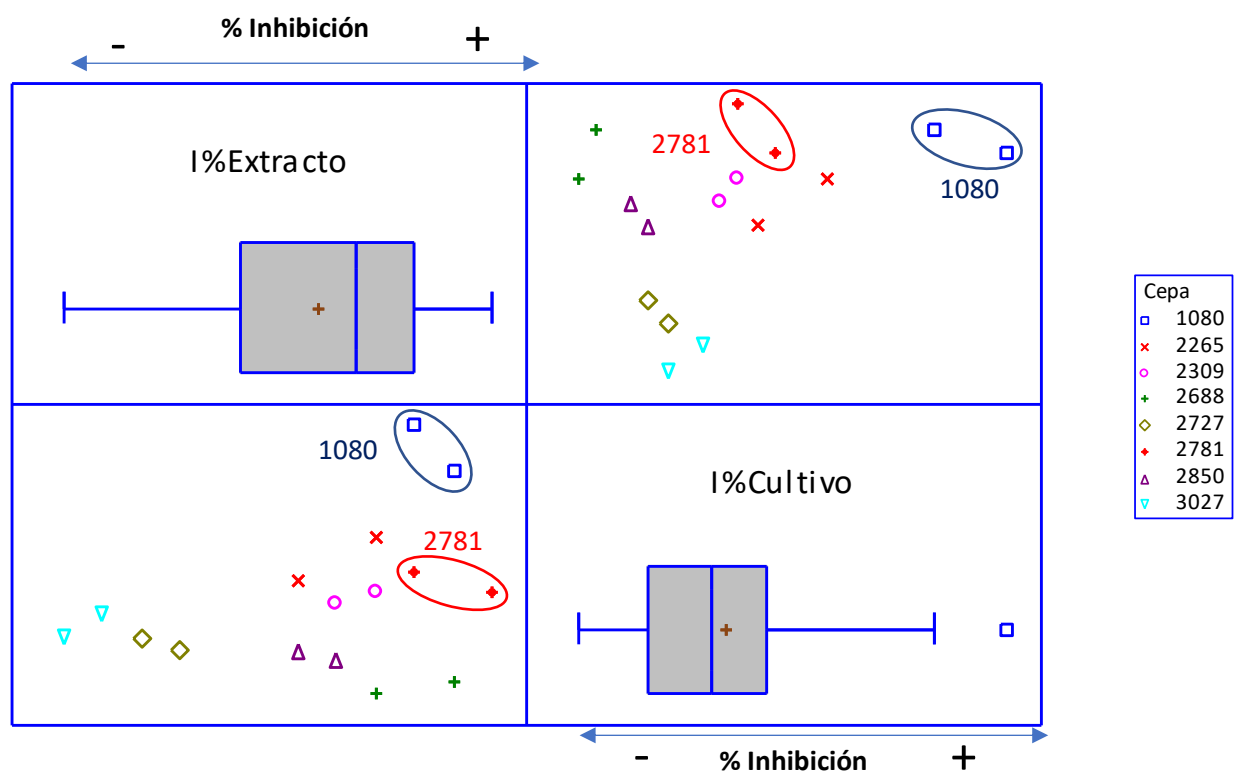


Figura 18. Gráfico de matriz donde se muestra la dispersión de las cepas en función de los valores de enfrentamiento en placa: I (%) Cultivo (porcentaje de inhibición empleando cultivo celular); I (%) Extracto (porcentaje de inhibición empleando extracto acelular). Aparecen resaltadas las dos cepas seleccionadas para el siguiente ensayo: 1080 (en azul) y 2781 (en rojo).

3.1.3. Cuantificación de la inhibición a partir de extractos acelulares en microplacas

Paralelamente, las cepas que resultaron positivas frente a *Botrytis cinerea* mediante la aplicación de su extracto filtrado, fueron sometidas a un ensayo con el objetivo de comprobar la persistencia de la efectividad de las sustancias producidas por las bacterias con el paso del tiempo, sin encontrarse el microorganismo presente. Para ello, en microplaca con 48 pocillos, se efectuó un enfrentamiento entre una alícuota del hongo fitopatógeno y extracto acelular de las cepas positivas, con carácter antagonista, con el fin de cuantificar la viabilidad del fitopatógeno en presencia de dichos extractos acelulares. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron concluyentes.

No se observó viraje de color azul a rosa, lo que implicaría la incapacidad del hongo fitopatógeno para crecer en presencia de los extractos acelulares de las bacterias probadas, seleccionadas en el experimento anterior. Este hecho, coincide con la capacidad de supresión observada anteriormente (Figura 16), sin embargo, esta ausencia categórica de crecimiento, con tal homogeneidad de resultados negativos, discrepa de los diferentes porcentajes de inhibición mostrados por cada extracto. Por lo tanto, no se pudo cuantificar concretamente la evolución de la carga fúngica en presencia de los extractos, siendo necesaria una puesta a punto mayor de la técnica, imposible de alcanzar dadas las circunstancias acontecidas por la Pandemia de Covid-19.

3.2. Evolución del desarrollo de la enfermedad del moho gris en hojas infectadas con *Botrytis cinerea*: diferencias tras la aplicación de tratamientos preventivos

Para comprobar la efectividad de las cepas finalmente seleccionadas en el apartado 3.1.2., se ejecutó el protocolo explicado en el apartado 2.5. En la Figura 19 se representa la disposición del ensayo.

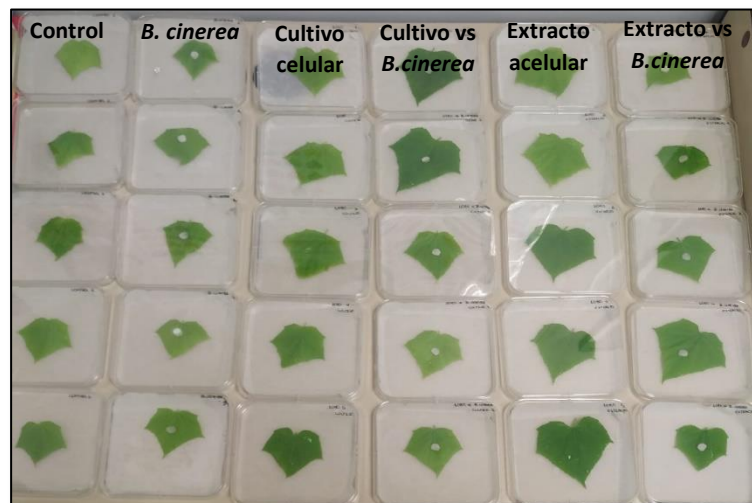


Figura 19. Diseño experimental del ensayo sobre el tratamiento preventivo con cepas ACBs en hojas de pepino.

Tras la incubación de las placas, se procedió a efectuar la medida del crecimiento del fitopatógeno sobre la hoja de cultivo de cada una de las 5 réplicas realizadas en cada caso: control positivo (sólo con fitopatógeno); control negativo (sin tratamiento ACB ni patógeno); hongo en hoja pretratada con cultivo celular; y hongo en hoja pretratada con extracto acelular, tanto para la cepa 1080 como para la 2781, tal como se recoge en la Figura 20.

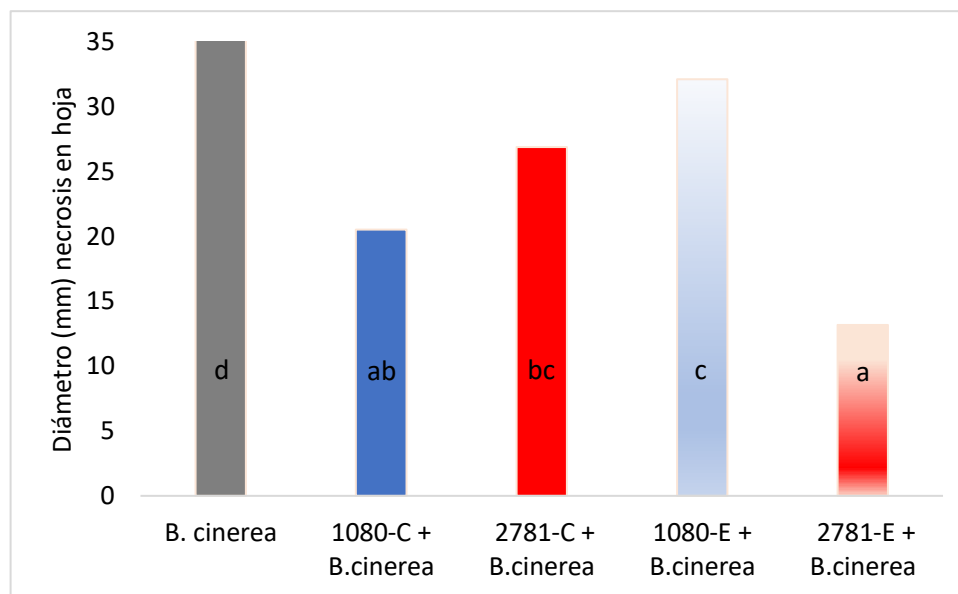


Figura 20. Medida del diámetro del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* sobre hojas pretratadas con cultivos celulares o extractos acelulares de las cepas seleccionadas en los ensayos anteriores (1080 y 2781). Distintas letras reflejan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Atendiendo a los resultados de la gráfica (Figura 20), *Botrytis cinerea* se vio afectado por todos los tratamientos empleados. El crecimiento del fitopatógeno en presencia del cultivo celular de la cepa 1080 fue menor que respecto a la cepa 2781, situándose el cultivo de esta cepa en ventaja sobre el hongo, coincidiendo con los resultados mostrados en el enfrentamiento dual en placa con la bacteria 1080. Sin embargo, no ocurrió así en el caso de los extractos. En este caso, donde factores adicionales a los que se pueden controlar en un medio de cultivo axénico que impidan el acceso de microorganismos no deseados intervienen, incluyendo la propia microbiota del vegetal, el extracto de la cepa 2781, fue más efectivo que el extracto de la cepa 1080. De hecho, fue el tratamiento que disminuyó con mayor efectividad el desarrollo de *Botrytis* sobre las hojas. De todos modos, teniendo en cuenta el análisis estadístico, no hay diferencias significativas entre tratamientos, pero sí con el control, lo que convierte a estas cepas, en las dos condiciones probadas, en potenciales herramientas de control biológico que merece la pena estudiar en mayor profundidad.

Adicionalmente, el estado sanitario de las hojas tras los 5 días de incubación fue evaluado visualmente, de manera cualitativa, siguiendo la escala establecida en el apartado 2.5. En la

Figura 21 se recoge la valoración del daño provocado por *B. cinerea* en cada caso, para las dos cepas y en las dos condiciones estudiadas, así como el control con el fitopatógeno. Además, en las Figuras 22 y 23, se muestran las fotografías correspondientes a dicho experimento.

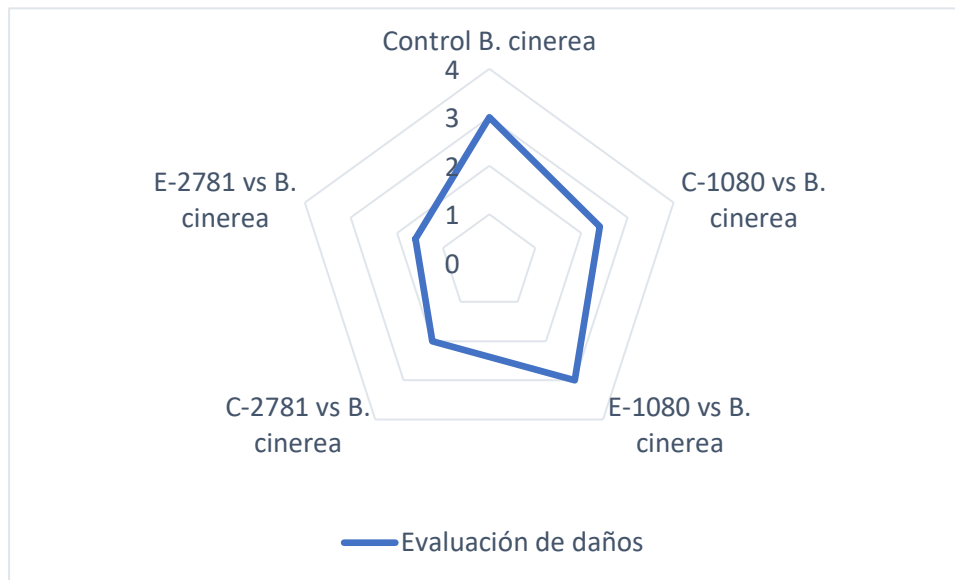


Figura 21. Valoración del daño provocado por *B. cinerea* en hojas control y en hojas sometidas a pretratamientos con extracto acelular filtrado (E-1080 y E-2781) y con cultivo celular (C-1080 y C-2781).

Como era de esperar, en las réplicas del Control, sin *Botrytis cinerea* (Figuras 22 y 23), las hojas permanecieron sanas, mientras que en aquellas en las que sólo estuvo presente el hongo, éstas experimentaron un daño severo, en concreto, el ablandamiento y podredumbre alrededor del tejido en contacto con el plug proveniente de un cultivo del fitopatógeno (Figuras 21, 22 y 23). La evaluación de los síntomas, junto a las medidas del diámetro de la lesión necrótica (Figura 20), sitúan la aplicación de la cepa 1080 de forma directa en el mismo rango de actuación que el extracto estéril de la cepa 2781, por un lado, y el extracto estéril de 1080 con una menor eficiencia, al igual que el cultivo de la cepa 2781.

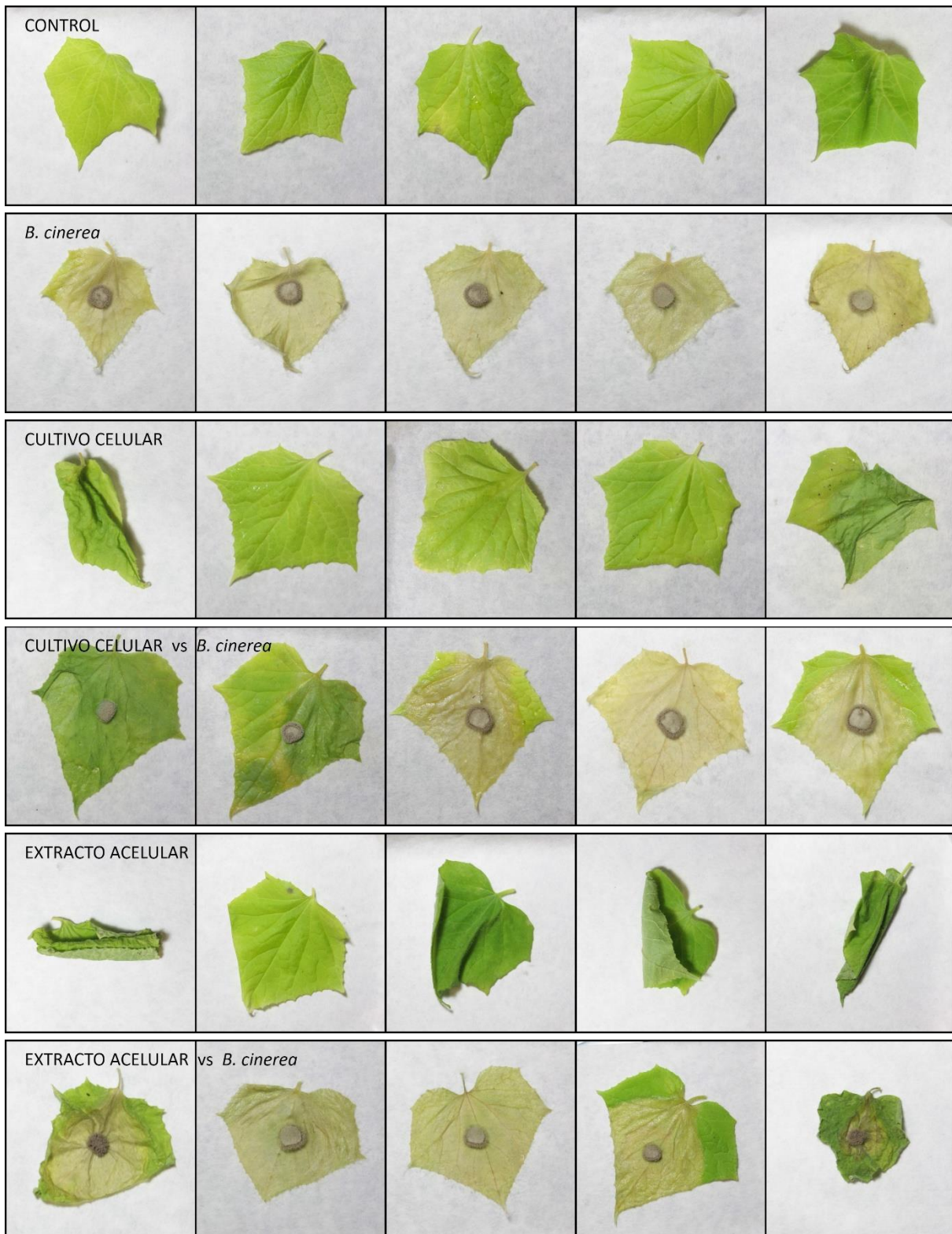


Figura 22. Evaluación visual de los daños en hojas de pepino empleando la cepa 1080.



Figura 23. Evaluación visual de los daños en hojas de pepino empleando la cepa 2781.

Este resultado fue apoyado estadísticamente como se observa en la Figura 24, donde se observa la distribución de los 4 tratamientos estudiados.

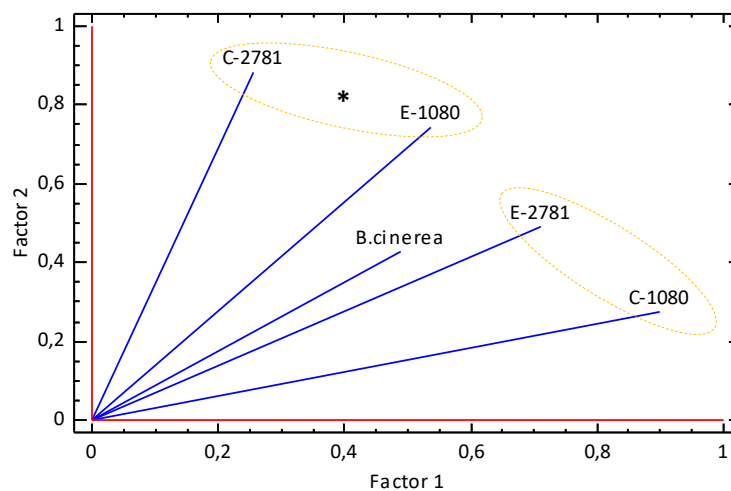


Figura 24. Análisis de factores empleando los datos cuantitativos de la medida de la necrosis en hoja expresada en mm (Figura 20) y los datos cualitativos, interpretados numéricamente, respecto a los daños observados en las hojas (Figura 21), con el objetivo de establecer la variabilidad existente entre los distintos tratamientos. Aparece marcado con asterístico el grupo de tratamientos más prometedores.

Bacillus subtilis es una bacteria con capacidad antagonista frente a *Botrytis cinerea* que ha quedado patente durante el desarrollo de este trabajo, observándose la reducción del inóculo en placa y de la lesión necrótica en hoja. El hecho de que tanto los microorganismos en presencia del patógeno, como los productos derivados de los agentes antagonistas sean efectivos, añade interés en el estudio del uso de esta especie microbiana en concreto como agente de control biológico frente a un hongo fitopatógeno que está mostrando resistencia a un enorme rango de pesticidas químicos y, por tanto, dificultando el control de esta dañina enfermedad (Elmer y Reglinsk, 2006). En este trabajo las cepas con mayor potencial resultaron ser 1080 y 2781. Por su parte, la cepa 1080 destacó sobre el resto de la colección ensayada durante el cribado inicial en placa. Sin embargo, en el ensayo sobre tejido vegetal, se observó un fenómeno inesperado, ya que el extracto acelular estéril de la cepa 2781 resultó ser el tratamiento más efectivo para impedir el crecimiento de *Botrytis*. Teniendo en cuenta la susceptibilidad de los microorganismos y sus productos en condiciones más cercanas a las reales que las de una placa de Petri, el uso de consorcios microbianos mejoraría el rango de actuación de formulados microbianos como potenciales ACBs.

Finalmente, dado que la situación académica se vio afectada por la pandemia originada por el SARS-CoV-2, algunos de los experimentos previstos se vieron interrumpidos. Por ejemplo, la optimización del ensayo cuantitativo en microplacas con resazurina, que no pudo repetirse, o el ensayo en hoja, pero con cultivo de melón, ya que la idea original cubría el estudio de ambos hospedadores vegetales.

4. Conclusiones

A partir de los resultados recopilados tras la realización de los experimentos se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- 1) La especie *Bacillus subtilis* presenta características metabólicas y fisiológicas interesantes para su empleo como agente de control biológico frente a *Botrytis cinerea*, siendo capaz de frenar su crecimiento mediante la producción de moléculas bioactivas.
- 2) Tanto la presencia directa de *Bacillus subtilis* como los extractos acelulares estériles generados a partir de esta bacteria se muestran eficaces para frenar los síntomas de la enfermedad del moho gris con *Botrytis cinerea* como su agente causal en multitud de cultivos.
- 3) Las cepas de *B. subtilis* 1080, en forma de cultivo celular viable, y 2781, en forma de extracto acelular estéril, presentan una elevada capacidad antagonista frente al fitopatógeno, situándolas como las más prometedoras agentes biopesticidas de la colección estudiada.

BIBLIOGRAFÍA

- Acurio, R., Ñacato, C. y Valencia, M. (2018). Cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol *in vitro* de *Alternaria* spp. en *Brassica oleracea* var. *Italica*. *Revista Bionatura*, 3(2), 607-611.
- Asaka, O. y Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4081-4085.
- Backhouse, D. y Willetts, H. J. (1984). A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(2), 171-178.
- Beever, R. E., y Weeds, P. L. (2007). Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (Eds.). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (pp. 29-52). Springer. Dordrecht, Países Bajos.
- Benito, E. P., Arranz, M. y Eslava, A. P. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micobiología*, 17, 43-46.
- Benjumeda-Muñoz, D. (2017). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
- Bolívar-Anillo, H. J., Garrido, C. y Collado, I. G. (2019). Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry Reviews*, 1-20.
- Chen, T. W. y Wu, W. S. (1999). Biological control of carrot black rot. *Journal of Phytopathology*, 147, 99-104.
- Chen, P. H., Chen, R. Y. y Chou, J. Y. (2018). Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology*, 46(1), 33-46.
- Chu, C. L., Liu, W. T., Zhou, T. y Tsao, R. (1999). Control of postharvest gray mold rot of modified atmosphere package sweet cherries by fumigation with thymol and acetic acid. *Canadian Journal of Plant Science*, 79(4), 685-689.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2020). Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis*. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>).
- Daugaard, H. (1999). Cultural methods for controlling *Botrytis cinerea* Pers. in strawberry. *Biological Agriculture and Horticulture*, 16(4), 351-361.
- Dik, A. J. y Wubben, J. P. (2007) Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (Eds.). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (pp. 319-333). Springer. Dordrecht, Países Bajos.
- Droby, S. y Lichter, A. (2007). Post-Harvest *Botrytis* infection: Etiology, development and management. En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (Eds.). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (pp. 349-367). Springer. Dordrecht, Países Bajos.

- Earl, A. M., Losick, R. y Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends in Microbiology, 16(6), 269-275.
- Elad, Y. y Yunis, H. (1993). Effect of microclimate and nutrients on development of cucumber gray mold. Phytoparasitica, 21(3), 257-268.
- Elmer, P. A. G. y Reglinsk, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. Plant Pathology, 55, 155-177.
- Epton, H. A. S. y Richmond, D. V. (1980). Formation, structure and germination of conidia. En: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. y Jarvis, W.R (Eds.), The Biology of *Botrytis*. (pp. 41-83). Academic Press. Londres, Reino Unido.
- Faretra, F. y Pollastro, S. (1991). Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Mycological Research, 95(8), 943–951.
- Finkers, R., van den Berg, P., van Berloo, R., ten Have, A., van Heusden, A. W., Van Kan, J. A. L. y Lindhout, P. (2007). Three QTLs for *Botrytis cinerea* resistance in tomato, 114(4), 585-593.
- Furuya, S., Mochizuki, M., Aoki, Y., Kobayashi, H., Takayanagi, T., Shimizu, M. y Suzuki, S. (2011). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. Biocontrol Science and Technology, 21(6), 705-720.
- Guimarães, R., Chetelat, R. y Stotz, H. (2004). Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* is dominant in hybrids with tomato and involves induced hyphal death. European Journal of Plant Pathology, 110(1), 13-23.
- Hang, N. T. T., Hur, J. S., Kim, G. H., Koh, Y. J. y Oh, S. O. (2005). *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. The Plant Pathology Journal, 21(1), 59-63.
- Harris, A. R. y Adkins, P. G. (1999). Versatility of fungal and bacterial isolates for biological control of damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora* spp. Biological Control, 15, 10-18.
- Ibiene, A. A., Agogbua, J. U., Okonko I. O. y Nwachi, G. N. (2012). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizer: Effect on growth of *Lycopersicon esculentum*. Journal American Science, 8(2), 318-324.
- Kaspar, F., Neubauer, P. y Gimpel, M. (2019). Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. Journal of Natural Products, 82(7), 2038-2053.
- Karki, P. B., Toshi, S., Chaudhary, G. y Chaudhary, R. N. (1993). Studies on *Botrytis* gray mould of chickpea in Nepal. Recent Advances in Research on 8GM of Chickpea, 11-13.

- Kim, Y. S., Song, J. G., Lee, I. K., Yeo, W. H. y Yun, B. S. (2013). *Bacillus* sp. BS061 supresses powdery mildew and gray mold. *Mycobiology*, 41(2), 108-111.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I. Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S, Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S.-K., Codani, J.-J., Connerton, I. F., Cummings, N. J., Daniel, R. A., Denizot, F., Devine, K. M., Düsterhöft, A., Ehrlich, S. D., Emmerson, P. T., Entian, K. D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.-Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E. J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B. J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C. R., Hénaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.-F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.-M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Maüel, C., Médique, C., Medina, N., Mellado, R. P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.-H., Varro, V., Pohl, T. M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A. M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Serror, P., Shin, B.-S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandebol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H.-F., Zumstein, E., Yoshikawa, H. y Danchin, A (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249–256.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M. y Chapeland, F. (2002) Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58(9), 876-888.
- Maude, R. B. (1980). Disease control. En: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. y Jarvis, W.R (Eds.), *The Biology of Botrytis*. (pp. 275-308). Academic Press. Londres, Reino Unido.
- Martínez-Bracero, M. (2019). Estudio aerobiológico y fenológico de viñedos de la denominación de origen Montilla-Moriles. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- Miura, I., Kamakura, T., Maeno, S., Hayashi, S. y Yamaguchi, I. (1994) Inhibition of enzyme secretion in plant pathogens by mepanipyrim, a novel fungicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 48(3), 222-228.

- Moyano, C., Raposo, R., Gomez, V. y Melgarejo, P. (2003). Integrated *Botrytis cinerea* management in southeastern Spanish greenhouses. *Journal of Phytopathology*, 151(2), 80–85.
- Pak, G. A. (1988). Selection of *Trichogramma* for inundative biological control. Tesis doctoral, Universidad de Wageningen. Wageningen, Países Bajos.
- Palou, L., Crisosto, C. H. y Garner, D. (2006). Combination of postharvest antifungal chemical treatments and controlled atmosphere storage to control gray mold and improve storability of 'Wonderful' pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*, 43(1), 133-142.
- Peng, G., Sutton, J. C. y Kevan, P. G. (1992). Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal Plant Pathology*, 14(2), 117–129.
- Pusey, P. L., Hotchkiss, M. W., Dulmage, H. T., Baumgardner, R. A., Zehr, E. I., Reilly, C. C. y Wilson, C. L. (1988). Pilot tests for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for post-harvest control of peach brown rot. *Plant Disease* 72(7), 622– 626.
- Realpe, M. E., Hernández, C. A., y Agudelo, C. I. (2002). Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Revista Biomédica*, 22(2), 106.
- Reuveni, R., Raviv, M. y Bar, R. (1989). Sporulation of *Botrytis cinerea* as affected by photoselective sheets and filters. *Annals of Applied Biology*, 115(3), 417–424.
- Reuveni, R. y Raviv, M. (1992). The effect of spectrally modified polyethylene films on the development of *Botrytis cinerea* in greenhouse grown tomato plants. *Biological Agriculture and Horticulture*, 9(1), 77–86.
- Rey-Casal, C. (2014). Ensayo de inducción de resistencia a *Botrytis cinerea* en judía (*Phaseolus vulgaris*) con un extracto de hinojo (*Foeniculum vulgare*). Trabajo Fin de Grado, Universidad de La Coruña. La Coruña, España.
- Rooney, A. P., Price, N. P. J., Ehrhardt, C., Swezey, J. L. y Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. *nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2429–2436.
- Rosslénbroich, H. J. y Stuebler, D. (2000) *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19(8), 557–561.
- Plan del sector hortícola de Almería. (2002). Servicio de información fitosanitaria de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. (http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/prospectiva/Frutas%20y%20hortalizas3_doc.pdf).

- Sleper, D. A. y Poehlman, J. M. (2006). *Breeding Field Crops*. (pp. 424). Blackwell publishing, Nueva Jersey, Estados Unidos.
- Suárez-Estrella, F., Bustamante, M. A., Moral, R., Vargas-García, M. C., López, M. J., Moreno, J. (2012). *In vitro* control of Fusarium wilt using agroindustrial subproduct-based composts, *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 59-70.
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A. y Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1151-1160.
- Tripathi, H. S. y Rathi, P. S. (2000). Effect of certain cultural practices on severity *Botrytis* gray mould of chickpea. *Indian Phytopathology*, 53(2), 172-174.
- UAL (Universidad de Almería). (2017a). Pruebas enzimáticas en *Bacillus subtilis*. Imagen extraída del Guion de Prácticas de Microbiología de la Universidad de Almería.
- UAL (Universidad de Almería). (2017b). Aislamiento mediante técnica de estriado en placa Imagen extraída del Guion de Prácticas de Microbiología de la Universidad de Almería.
- UNICACH (Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas). (2014). Estreptobacilos Grampositivos. Imagen extraída del Cepario de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. (<https://cepariounicach.wordpress.com/2014/09/24/bacillus-subtilis/>).
- Van Kan, J. A. L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11(5), 247–253.
- Van Lenteren, J. C., Babendreier, D., Bigler, F., Burgio, G., Hokkanen, H. M. T., Kuske, S., Loomans, A. J. M., Menzler-Hokkanen, I., Van Rijn, P. C. J., Thomas, M. B., Tommasini, M. G. y Zeng, Q. Q. (2003). Environmental risk assessment of exotic natural enemies used in inundative biological control. *BioControl*, 48(1), 3-38.
- West, J. S., Pearson, S., Hadley, P., Wheldon, A. E., Davis, F. J., Gilbert, A. y Henbest, R. G. C. (2000). Spectral filters for the control of *Botrytis cinerea*. *Annals of Applied Biology*, 136 (2), 115–120.
- Williamson, B., Duncan, G. H., Harrison, J. G., Harding, L. A., Elad, Y. y Zimand, G. (1995). Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 99(11), 1303–1310.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. y Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561-580.
- Xiao, C. L., Chandler, C. K., Price, J. F., Duval, J. R., Mertely, J. C. y Legard, D. E. (2001). Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. *Plant Disease*, 85(8), 901-909.