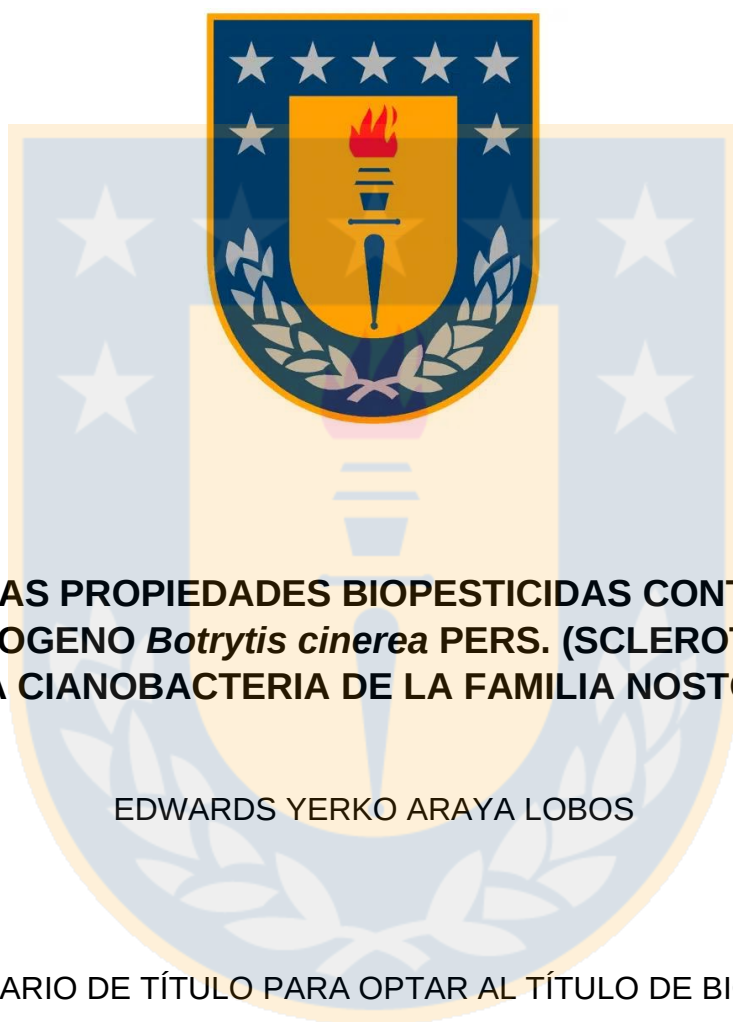


UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
BIOLOGÍA



**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOPESTICIDAS CONTRA EL HONGO
FITOPATOGENO *Botrytis cinerea* PERS. (SCLEROTINIACEAE) DE
UNA CIANOBACTERIA DE LA FAMILIA NOSTOCACEAE**

EDWARDS YERKO ARAYA LOBOS

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

CONCEPCIÓN – CHILE

MARZO, 2022.

Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Este Seminario de Título ha sido realizado en FICOLAB, Grupo de Investigación Microalgal del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

Profesora guía

Dra. Patricia Gómez Vergara

Universidad de Concepción
Concepción

Profesores evaluadores

Dra. Fabiola Cruces López

Universidad de Concepción
Concepción

Dr. Götz Palfner

Universidad de Concepción
Concepción

Coordinador seminario de título

Dr. Víctor Hernández Santander

Universidad de Concepción
Concepción

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos van dirigidos a todo el equipo de FICOLAB por recibirme y hacer sentir cómodo en todo momento. Agradecer muy especialmente a la Dra. Patricia Gómez, quien me guio durante mis últimos dos años de formación en la carrera de Biología: por la confianza depositada en mí, por darme la posibilidad de ser parte del Ficolab y hacer de cada día, un buen día para aprender algo nuevo, por su infinita paciencia, por permitirme tropezar una y otra vez (y otra vez) hasta que no se quede ningún detalle atrás, por incentivar en todo momento el trabajo impecable y no dejar espacio para aproximaciones y, sobre todo, por estar siempre dispuesta a pararse frente a una pizarra, a rediseñar un experimento al verdadero estilo de “Pinky y Cerebro”, gracias profe Paty.

A Sandra Bobadilla, por su amabilidad y excelente disposición, no tengo duda de que, sin su ayuda, aún estaría terminando los análisis bioquímicos.

Al Nicolás, por ver los problemas técnicos y la solución al mismo tiempo, por darme la posibilidad de “meter las manos” a pesar de no saber mucho.

Al Dr. José Becerra del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción, por ayudarnos a conseguir la cepa de *Botrytis cinerea* y al Dr. Pedro Aqueveque de la Universidad de Concepción, campus Chillán, por donar la cepa de *Botrytis cinerea* utilizada en el presente estudio.

Finalmente, no puedo dejar pasar la oportunidad de agradecer a mi familia, por creer en mí y ser mi motor durante todos estos años.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo general	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. METODOLOGÍA	16
4.1. Material biológico	16
4.2. Estimación del crecimiento de la cianobacteria	16
4.3. Cosecha de la biomasa de la cianobacteria	17
4.4. Preparación de los extractos de la cianobacteria	18
4.5. Análisis bioquímico	18
4.5.1. Determinación de proteínas totales y pigmentos ficobilínicos	18
4.5.2. Determinación de carbohidratos totales	19
4.5.3. Cuantificación de pigmentos carotenoides y clorofila (a)	19
4.5.4. Determinación de la capacidad antioxidante	19
4.5.5. Determinación de fenoles y flavonoides totales	19
4.6. Bioensayo de actividad fungicida	20
4.7. Identificación taxonómica	21
4.7.1. Análisis molecular	21
4.7.2. Descripción morfológica	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Crecimiento del cultivo	22
5.2. Composición bioquímica y actividad antioxidante	26
5.3. Bioensayo de actividad fungicida	28

5.4.	Identificación taxonómica	34
5.4.1.	<i>Caracterización morfológica</i>	34
5.4.2.	<i>Análisis molecular</i>	37
6.	DISCUSIÓN	40
6.1.	Atributos de crecimiento	40
6.2.	Composición bioquímica	41
6.3.	Identificación taxonómica	42
6.4.	Bioensayo de actividad fungicida	42
7.	CONCLUSIONES	50
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Auto-floculación en cultivos de la cepa CCM-UdeC 219	22
Figura 2. Aclimatación y cultivo de la cepa CCM-UdeC 219	24
Figura 3. Curva de crecimiento de la cepa CCM-UdeC 219 en medio BG-11.....	25
Figura 4. Curva de crecimiento de la cepa CCM-UdeC 219 en medio BG-11 (GT)	26
Figura 5. Determinación de peso seco y concentración de clorofila (a) del cultivo de la cepas CCM-UdeC 219 durante la fase estacionaria (día de la cosecha de los cultivos).....	26
Figura 6. Liofilización de biomasa de la cepa CCM-UdeC 219.....	27
Figura 7. Cepa de <i>B. cinerea</i> utilizada en este estudio cultivada en medio PDA, contorno del inoculo presenta formación de estructuras con micelio compactado (esclerocios).	28
Figura 8. Cepa del hongo fitopatógeno <i>B. cinerea</i> utilizado en este estudio	29
Figura 9. Preparación de extractos de metanol	30
Figura 10. Bioensayo de actividad fungicida de los extractos acuosos (EP1 y EP2), extractos de acetona (EA1 y EA2) y extractos de metanol (EM1 y EM2) obtenidos desde la cepa CCM-UdeC 219.....	31
Figura 11. Extracto acuoso proveniente de la biomasa de la cepa CCM-UdeC 219 previo a su liofilización	32
Figura 12. Bioensayo de actividad fungicida	34
Figura 13. Observaciones bajo el microscopio de la cepa CCM-UdeC 219 creciendo en diferentes medios de cultivo	37
Figura 14. Cepa CCM-UdeC 219 creciendo en medio Watanabe	37
Figura 15. Gel de agarosa con productos de PCR región ITS utilizando los partidores 16S3'F y 23S5'R	38
Figura 16. Bandas aisladas desde el gel de agarosa preparativo para su posterior purificación y secuenciación.	39
Figura 17. Electroferograma de la secuencia <i>forward</i> de la región ITS de la cepa CCM- UdeC 219 obtenida por secuenciación automática.....	40
Figura 18. <i>Nodularia</i> sp. "Saline 2" (Rehakova <i>et al.</i> , 2014).....	48

Figura 19. a – c: *T. kashiensis*, d – f: *Anabaena kashiensis* y g – j: *Anabaena variabilis*
var. *kashiensis* (Komárek, 2013).....49



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición bioquímica y capacidad antioxidante del extracto acuoso y biomasa, de la cepa CCM-UdeC 219 creciendo en medio de cultivo BG-11 y BG-11 (GT)	28
Tabla 2. Medidas citomorfométricas de la cepa CCM-UdeC 219 creciendo en diferentes medios de cultivo	35



RESUMEN

Las infecciones fúngicas en plantas por fitopatógenos generan pérdidas sustanciales en la producción agrícola de diferentes cultivos. Las medidas tradicionales de control incluyen sustancias con un elevado costo ambiental y han ido perdiendo eficiencia durante las últimas décadas, producto de la resistencia desarrollada por algunos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*. Por otro lado, la agricultura se ha visto enfrentada a las nuevas exigencias del mercado internacional, que progresivamente han ido incorporando políticas de desarrollo sustentable, en base a productos más amigables con el medio ambiente. En este sentido, las cianobacterias son muy prometedoras como potenciales nuevas fuentes naturales y sustentables de sustancias biopesticidas y bioestimulantes. Este trabajo tuvo como objetivo, determinar la identidad taxonómica y el potencial biotecnológico de una cianobacteria nativa de la familia Nostocaceae, depositada en la Colección de Cultivo de Microalgas de la Universidad de Concepción (CCM-UdeC), Chile: cepa CCM-UdeC 219, como potencial fuente de compuestos biopesticidas antifúngicos sobre el fitopatógeno *B. cinerea*. Se determinó que la cepa acumula cerca de un 40% de proteínas creciendo en medio de cultivo BG-11, contenido que se reduce a la mitad en cultivos creciendo en medio BG-11 de bajo costo y con deficiencia de hierro. La capacidad antioxidante del extracto acuoso fue 152,4 $\mu\text{mol trolox/g}$ y la composición de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina fue: 17.07, 5.73 y 2.4 (% de la biomasa) respectivamente. Además, la cepa es capaz de crecer en cultivos hasta volúmenes de 18 L, utilizando un medio de cultivo preparado con reactivos grado técnico. El extracto acuoso no mostró propiedades antifúngicas, pero si una interesante composición bioquímica y propiedades antioxidantes. El extracto de acetona tampoco tuvo efecto fungicida, mientras que el extracto metanólico inhibió eficazmente el crecimiento del hongo *B. cinerea*, actividad que podría atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos en el extracto. Por otro lado, mediante la combinación de un análisis morfológico y molecular (secuenciación de la región ITS del cistron ribosomal) se logró determinar que la cepa pertenecería al género *Trichormus*.

ABSTRACT

Fungal infections in plants by phytopathogens generate substantial losses in the agricultural production of different crops. Traditional control measures include substances with a high environmental cost and have been losing efficiency in recent decades because of the resistance developed by some phytopathogens such as *Botrytis cinerea*. On the other hand, agriculture has been faced with the new demands of the international market, which have progressively incorporated sustainable development policies, based on more eco-friendly products. In this sense, cyanobacteria are very promising as potential new natural and sustainable sources of biopesticide and biostimulant substances. The objective of this work was to determine the taxonomic identity and biotechnological potential of a native cyanobacterium of the Nostocaceae family, deposited in the Colección de Microalgas de la Universidad de Concepción (CCM-UdeC), Chile: CCM-UdeC 219 strain, as a potential source of antifungal biopesticide compounds against the phytopathogen *B. cinerea*. It was determined that the strain accumulates about 40% of proteins growing in BG-11 culture medium, a content that is reduced in cultures grown in BG-11 low-cost medium with iron deficiency. The antioxidant capacity of the aqueous extract was 152.4 $\mu\text{mol trolox/g}$ and the composition of phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin was: 17.073, 5.73 and 2.4, respectively. In addition, the strain can grow in cultures up to volumes of 18 L, using a culture medium prepared with technical grade reagents. The aqueous extract did not show antifungal properties, but it did show an interesting biochemical composition and antioxidant properties. The acetone extracts also had no fungicidal effect, while the methanolic extract effectively inhibited the growth of the fungus *B. cinerea*, an activity that could be attributed to the presence of phenolic compounds in the extract. On the other hand, by combining a morphological and molecular analysis (sequencing of the ITS region of the ribosomal cistron) it was possible to determine that the strain would belong to the genus *Trichormus*.

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo, se estima que más de un tercio de los alimentos destinados al consumo humano se pierden o son desperdiciados. Una de las principales causas son las infecciones por hongos en plantas, que producen pérdidas significativas en los cultivos agrícolas, esto ocurre principalmente durante el cultivo, cosecha, transporte y almacenamiento de frutas (Acuña, 2008; González *et al.*, 2009; Eguillor, 2017).

Diversas especies del género *Botrytis* (Sclerotinicaeae) comprenden algunos de los fitopatógenos fúngicos más dañinos que infectan una amplia variedad de cultivos agrícolas causando el síntoma del moho gris (Acuña, 2008; Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2016). *Botrytis cinerea* Pers. representa a la principal especie causante de pérdidas en cultivos de fresas, estimadas entre un 30 y 40 por ciento en cultivos comerciales (Brauer *et al.*, 2019); además, el fitopatógeno afecta considerablemente la producción de uva de mesa, uno de los cultivos frutales más valiosos del mundo, con un valor de exportación anual en el año 2016 de 68.000 millones de dólares; representando, además, un cultivo comercial de gran importancia económica para países sudamericanos como Perú y Chile (Alston & Sambucci, 2019).

El manejo de *B. cinerea* involucra principalmente el uso de pesticidas sintéticos del tipo Hidroxyalanidas, Anilinoimidazoles, Dicarboximidas, Carboxamida, Estrobilurinas, Fenilpirroles e IBE's; sin embargo, a ciertos niveles de presión ejercida por la enfermedad, estas medidas pierden eficacia (Molina *et al.*, 2006; INIA, 2016). La resistencia a los fungicidas es un problema grave que cuestiona la sostenibilidad de las actuales estrategias de control debido a que, durante las últimas tres décadas, el fitopatógeno *B. cinerea* ha desarrollado un alto índice de resistencia a prácticamente todos los pesticidas específicos utilizados para su control (Daugaard, 1999; Latorre *et al.*, 2002; Esterio *et al.*, 2007; Latorre & Torres, 2012). Adicionalmente, las restricciones establecidas por el mercado internacional en materia de pesticidas son cada vez más estrictas, lo que se debe en gran medida a que algunos pesticidas sintéticos, ampliamente utilizados en el mundo, han sido considerados por la OMS como altamente riesgosos para la salud a ciertos niveles de exposición (Cárdenas *et al.*, 2018). De este modo, se hace urgente la necesidad de contar con protectores de cultivos más eficientes,

que, además, se ajusten a las nuevas exigencias que impone el desarrollo de la agricultura sustentable; una alternativa es el uso de productos naturales, los cuales están cobrando cada vez mayor relevancia, ya que son más amigables con el medio ambiente (biodegradables), económicos y, en algunos casos, mejoran atributos de rendimiento de los cultivos (Tiwari & Sharma, 2013).

Las cianobacterias o también llamadas algas verde azules pertenecen a los seres vivos más antiguos de la Tierra. Son organismos procariontes cuya aparición en la era precámbrica marcó un antes y un después en la historia del planeta, ya que su capacidad de realizar fotosíntesis y generar oxígeno modificó la composición de la atmósfera de la Tierra y permitió el desarrollo de nuevas formas vivientes (Aguilera *et al.*, 2017). Actualmente, este grupo está representado por cerca de 2.000 especies pertenecientes a 150 géneros (Pulz & Gross, 2004). Las cianobacterias son organismos extremadamente resistentes y adaptados a diversos hábitats (Campos *et al.*, 2005), características que han llamado la atención de los investigadores y, en la actualidad, son ampliamente utilizadas en biotecnología como fuente de compuestos bioactivos (Pulz & Gross, 2004; Garlapati *et al.*, 2019).

Numerosos trabajos publicados ponen en evidencia el enorme potencial de las cianobacterias en la búsqueda de biopesticidas que actúen sobre fitopatógenos fúngicos. Diversos investigadores han explorado las propiedades anti-fitopatogénicas de los extractos obtenidos desde cianobacterias y atribuyen su actividad a biomoléculas de naturaleza proteica, peptídica y compuestos fenólicos, presentes en los extractos obtenidos desde la biomasa y filtrados de cultivo de cianobacterias (revisado en Araya & Gómez, manuscrito en preparación).

La producción de péptidos antimicrobianos (AMP) en cianobacterias es un hecho bastante sustentado en la literatura. Estas biomoléculas tienen un amplio espectro de utilización contra bacterias, hongos y virus (Verdugo *et al.*, 2019). Las propiedades anti-fitopatogénicas de los AMP se atribuyen a su capacidad de interactuar con esteroides de membrana, creación de poros y canales iónicos que alteran la integridad y permeabilidad normal de las membranas de los hongos; además, participan en la regulación de respuestas de defensa en las plantas (Xue *et al.*, 2018; Malviya *et al.*, 2020). Por otro lado, ciertos metabolitos secundarios de algunas cianobacterias han mostrado ser eficaces mejorando las respuestas anti-fitopatogénicas en plantas mediante inducción de la actividad oxidativa. Estas moléculas actuarían como

bioestimulantes, aumentando la actividad de la enzima peroxidasa y la acumulación de fitohormonas y compuestos fenólicos (Singh *et al.*, 2011).

A la fecha, se han realizado numerosos bioensayos exitosos utilizando extractos de cianobacterias cuyos autores atribuyen la bioactividad de los preparados a la presencia de compuestos fenólicos, extraídos principalmente con solventes orgánicos como metanol y acetona (e.g. Souza *et al.*, 2011; Haggag *et al.*, 2014; Pagnussatt *et al.*, 2014; Abdel *et al.*, 2015; Scaglioni, Blandino, *et al.*, 2018; Scaglioni, Oliveira, *et al.*, 2018). Este tipo de moléculas actuarían desnaturalizando proteínas de las membranas celulares de los fitopatógenos fúngicos, inhibiendo así su crecimiento; además, los compuestos fenólicos representan importantes antioxidantes debido a su capacidad de donar un hidrógeno o un electrón para formar radicales intermedios estables y se ha estudiado su rol en la inducción de mecanismos de defensa en las plantas (Hajimahmoodi *et al.*, 2009; Gamazo *et al.*, 2013).

Durante las últimas dos décadas, cerca de ciento cuarenta y cinco bioensayos han sido exitosos en la inhibición del crecimiento de fitopatógenos de interés agronómico alrededor del mundo utilizando extractos de cianobacterias, algunas de las especies más representativas de este grupo pertenecen a la familia Nostocaceae, principalmente a los géneros *Anabaena*, *Nostoc* y *Spirulina* (e.g. Kim, 2006., Seghiri *et al.*, 2019 & Zhou *et al.*, 2020, como se citó en Araya & Gómez, manuscrito en preparación).

Otros representantes de esta familia han sido estudiados por su capacidad de generar sustancias bioactivas de interés para la agricultura como fitohormonas y sideróforos, es así, como un estudio realizado por Toribio y colaboradores (2020), determinó que cepas de los géneros *Anabaena*, *Trichormus* y *Nostoc* actúan como bioestimulantes del crecimiento en plantas de pepino, atribuyendo su actividad a la capacidad de fertilizar el suelo mediante la solubilización del fosfato y a la producción de citoquininas, sideróforos y ácido salicílico, siendo este último un compuesto relacionado directamente con la activación de los mecanismos de defensa en las plantas.

Cabe destacar que, en la búsqueda de nuevos biopesticidas o bioestimulantes de origen microbiano, la selección de nuevas cepas de cianobacterias se ve influenciada por la variabilidad intraespecífica revelada en numerosas especies de microalgas (e.g. Sayegh &

Montagnes, 2011; Gómez *et al.*, 2016; Guedes *et al.*, 2019). Por otro lado, las condiciones de cultivo como: fotoperiodo, irradiancia, nutrientes, salinidad y temperatura son determinantes en la producción de compuestos bioactivos en cianobacterias (Berman *et al.*, 2007; Radhakrishnan *et al.*, 2009), lo cual abre la posibilidad de explorar la composición bioquímica y propiedades funcionales de los extractos de cianobacterias creciendo en diferentes condiciones.

La plasticidad fenotípica de las cianobacterias ha dificultado la identificación taxonómica en algunos grupos, en particular, las especies pertenecientes a la familia Nostocaceae (Wilmotte & Herdman, 2001). Se trata de un grupo filogenético especial que se caracteriza morfológicamente por presentar filamentos isopolares sin ramificaciones, formadores de heterocistos y acinetos paraheterocíticos o apoheterocíticos (Komárek, 2010). Actualmente la identificación de los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* y *Nostoc* de basa en características morfológicas del filamento, células vegetativas, heterocistos y acinetos, además, algunas especies se pueden identificar en base a la presencia de vaina y vesículas de gas (Rajaniemi *et al.*, 2005; Komárek, 2010). En este sentido, algunos estudios filogenéticos han demostrado la existencia de un conflicto entre las relaciones filogenéticas y la clasificación morfológica tradicional en este grupo en particular, sugiriendo su estudio mediante enfoques morfológicos y genéticos combinados (Rajaniemi *et al.*, 2005).

La cepa CCM-UdeC 219 corresponde a una cianobacteria de la familia Nostocaceae aislada desde Chigualoco, Los Vilos, Región de Coquimbo, Chile. Esta cepa está depositada en la Colección de Cultivo de Microalgas de la Universidad de Concepción (CCM-UdeC), su identidad taxonómica no es clara y sus potenciales propiedades biopesticidas no han sido previamente exploradas. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue determinar el potencial biotecnológico de la cepa CCM-UdeC 219 como fuente de compuestos biopesticidas antifúngicos sobre el fitopatógeno *B. cinerea* y determinar su identidad taxonómica mediante análisis morfológico y molecular.

2. HIPÓTESIS

1. La cepa CCM-UdeC 219 acumula compuestos con actividad fungicida contra el hongo fitopatógeno *B. cinerea*.
2. Es posible escalar el cultivo de la cepa CCM-UdeC 219, utilizando insumos de bajo costo.
3. El análisis morfológico y molecular de la cepa CCM-UdeC 219 permitirá determinar su identidad taxonómica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la identidad taxonómica y el potencial biotecnológico de la cepa CCM-UdeC 219 como potencial fuente de compuestos biopesticidas antifúngicos sobre el fitopatógeno *B. cinerea*

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar los atributos de crecimiento y la composición bioquímica de la biomasa de la cepa CCM-UdeC 219.
2. Obtener, caracterizar y determinar las propiedades antifúngicas contra *B. cinerea* de un extracto acuoso de la biomasa de la cepa CCM-UdeC 219.
3. Obtener un extracto de acetona y metanol de la biomasa de la cepa CCM-UdeC 219 y determinar sus propiedades antifúngicas contra *B. cinerea*
4. Determinar la factibilidad de escalar el cultivo de la cepa CCM-UdeC 219, utilizando insumos de bajo costo.
5. Determinar la identidad taxonómica de la cepa CCM-UdeC 219 mediante análisis morfológico y molecular.

4. METODOLOGÍA

4.1. Material biológico

La cepa incluida en este trabajo corresponde a CCM-UdeC 219, aislada en Chigualoco, Los Vilos, Región de Coquimbo, Chile. La cepa se encuentra depositada en la Colección de Cultivo de Microalgas (CCM-UdeC) de la Universidad de Concepción.

En los ensayos de actividad fungicida se utilizó una cepa del hongo fitopatógeno *B. cinerea* aislada en un cultivo de arándanos, donada por el Dr. Pedro Aqueveque, de la Universidad de Concepción, campus Chillán.

4.2.- Condiciones de cultivo

La cepa CCM-UdeC 219 fue cultivada en medio BG-11 (Stanier, 1971) y aclimatada a las condiciones experimentales por un periodo de dos semanas. Se establecieron 4 réplicas de 400 ml en matraces Erlenmeyer de 800 ml con una densidad inicial de 30 µg de clorofila a/litro. Se cultivaron en una sala con condiciones controladas: aireación constante, temperatura de 21±2°C, densidad de flujo fotónico de 100 µmoles/m²s y fotoperiodo 16:8 (Luz:Oscuridad), también se incluyó una réplica cultivada en medio BG-11 preparado con reactivos en su grado técnico y con ausencia de citrato de amonio férrico y ácido cítrico, denominado en adelante como BG-11(GT), este último fue escalado hasta 18 litros en condiciones controladas. Adicionalmente, se establecieron 4 cultivos en medio BG-11, BG-11(GT), Watanabe (Watanabe, 1960) y Spirulina (Starr & Zeikus, 1993) respectivamente, que fueron utilizados para la descripción morfológica de la cepa.

El hongo *B. cinerea* se cultivó en placas de Petri con agar de papa y dextrosa (PDA) y se mantuvo a 21±2°C hasta el inicio del bioensayo. Para la mantención del cultivo se realizaron repiques con frecuencia de 7 días aproximadamente o hasta que el micelio en crecimiento alcanzaba el borde de la placa de Petri.

4.2. Estimación del crecimiento de la cianobacteria

El crecimiento del cultivo fue determinado mediante extracción y cuantificación de clorofila (a), según Wegmann y Metzner (1971). Los datos de cuantificación de clorofila (a) se recolectaron cada 3 días de las 4 réplicas y los promedios fueron utilizados para construir la curva de crecimiento, a partir de las cuales se calculó la tasa de crecimiento máxima durante la fase

exponencial (capacidad de carga) y fue expresada en divisiones por día (d/d), utilizando la fórmula de Guillard (1973) como se detalla a continuación:

$$K = (3.322/t_2 - t_1) \times \text{Log} (N_2/N_1)$$

Donde: $t_1=6$, $t_2=12$; N_1 y N_2 es la densidad celular obtenida en los días t_1 y t_2 , respectivamente.

Además, se determinó el rendimiento del cultivo en la fase estacionaria, expresado como biomasa seca por litro de cultivo. Se utilizaron 4 filtros de nitrocelulosa secos (poro 0,45 μm) y previamente pesados para filtrar 2 ml de cultivo de cada réplica, posteriormente se dejaron secar en la estufa a 80°C durante 48 horas y se determinó el peso seco por volumen de cultivo utilizando la siguiente expresión:

$$\frac{\text{Gramos de Biomasa}}{\text{Litro de Cultivo}} = \frac{P_2 - P_1}{V} \times \frac{1000}{1}$$

Donde: P_1 =peso del filtro seco sin biomasa, P_2 =peso del filtro seco con biomasa, V =volumen de cultivo filtrado (ml).

4.3. Cosecha de la biomasa de la cianobacteria

Una vez que el cultivo llegó a la fase estacionaria se cosechó por centrifugación a 4900 r.p.m., por 10 minutos a 4°C. La biomasa se congeló a -20°C y luego fue liofilizada a -50°C y 100 militorr durante 24 horas aproximadamente en un liofilizador marca Virtis (Sentry 2.0 6KBTES-55). La biomasa seca se almacenó a -20°C hasta su uso.

Cada vez que se utilizó esta biomasa se corrigió su peso mediante la estimación de su porcentaje de humedad, pesando 10 mg de biomasa liofilizada de cada réplica con 3 sub-réplicas en sobres de papel secos previamente pesados. Luego se secaron en la estufa a 80°C durante 24 horas y se pesaron nuevamente. El porcentaje de humedad se determinó utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(PS_1 - PS_2) - (PS_3 - PS_2)}{PS_1 - PS_2} \times 100$$

Donde PS1=peso del sobre seco con la biomasa liofilizada sin secar, PS2=peso del sobre seco, PS3= peso del sobre seco con la biomasa liofilizada seca.

4.4. Preparación de los extractos de la cianobacteria

Para la preparación del extracto acuoso se pesó 0.6 g de biomasa liofilizada y se hidrató con 72 ml de agua destilada autoclavada (relación 1 g biomasa / 120 ml de agua) por 30 minutos a 4°C. Se realizó una serie de congelación y descongelación con 5 repeticiones a -80°C (10 minutos) y 30°C en baño termostático (20 minutos) respectivamente. Una vez descongelado se trituró con Ultra Turrax a 20000 r.p.m. en tres ciclos de 15 segundos. Se calculó la eficiencia extractiva de este método de la siguiente manera: se pesaron 20 mg de extracto acuoso liofilizado (con su peso corregido por humedad) de cada réplica en tubos falcon y se hidrataron con 20 ml de agua destilada durante 30 minutos a 4°C. Luego fueron centrifugadas a 6000 r.p.m. durante 60 segundos. El sobrenadante (extracto acuoso soluble) fue traspasado a un nuevo tubo y el pellet (biomasa no extraída) fue traspasado a un filtro de nitrocelulosa seco (poro 0,45 µm) y previamente pesado. Los filtros con la biomasa húmeda se secaron a 80°C durante 48 horas y se pesaron nuevamente. La eficiencia extractiva fue expresada utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Eficiencia extractiva (\%)} = \frac{F3 - (F2 - F1)}{F3} \times 100$$

Donde: F1=peso del filtro seco, F2=peso del filtro con el extracto después de secar y F3=peso del extracto acuoso liofilizado antes de hidratar.

El extracto de metanol y acetona se preparó pesando aproximadamente 0,5 g de biomasa liofilizada con dos replicas cada uno. Se agregaron los solventes en la relación 0,5 g/100 ml utilizando matraces Erlenmeyer de 500 ml. Se mantuvieron durante 20 horas en un agitador orbital a 80 r.p.m. y temperatura ambiente.

Posteriormente los extractos se traspasaron a una estufa a 35°C hasta eliminar completamente el solvente por evaporación.

4.5. Análisis bioquímico

4.5.1. Determinación de proteínas totales y pigmentos ficobilínicos

La extracción y cuantificación de proteínas totales de la biomasa y extracto acuoso se realizó mediante espectrofotometría de acuerdo con el método de Lowry (1951) y los resultados fueron

expresados como equivalentes de seroalbúmina de bovino (BSA %). En cuanto a la extracción y cuantificación de pigmentos ficobilínicos, se realizó según la metodología de extracción propuesta por Bennet y Bogoord (1973) y las relaciones matemáticas de Bermejo y colaboradores (2002).

4.5.2. *Determinación de carbohidratos totales*

La determinación de carbohidratos se realizó utilizando el método de la Antrona propuesto por Morris (1948), con algunas modificaciones: 0,2 g de Antrona fueron disueltos en 100 ml de ácido sulfúrico 96%. La curva patrón se realizó con diluciones seriadas a partir de una solución madre de glucosa 200 mg/L. Se prepararon volúmenes de 3 ml en tubos de vidrio con las siguientes concentraciones de glucosa: 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L y 10 mg/L. La muestra “blanco” fue preparada con 1 ml de agua destilada. Se utilizó 1 ml de cada réplica del extracto acuoso como muestra “problema”. Se agregaron 2 ml de Antrona H_2SO_4 a cada tubo y se agitaron en vortex. Una vez transcurridos 2 minutos de reposo en agua fría, se incubaron a 95°C durante 10 minutos en un baño termostático. Los tubos se mantuvieron en agua fría durante 5 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Jasco V-750) a 625 nm y los resultados fueron expresados como equivalentes de glucosa (%).

4.5.3. *Cuantificación de pigmentos carotenoides y clorofila (a)*

La determinación de la concentración de pigmentos carotenoides y clorofila (a) de la biomasa se realizó mediante espectrofotometría de acuerdo con la metodología de extracción descrita por Strickland y Parsons (1972) y las relaciones matemáticas Wegmann y Metzner (1971). Los resultados fueron expresados como porcentaje de pigmento/biomasa liofilizada.

4.5.4. *Determinación de la capacidad antioxidante*

Se determinó la capacidad reductora sobre el Fe^{+3} (FRAP) del extracto acuoso y biomasa según la metodología propuesta por Thaipong y colaboradores (2006). Los resultados fueron expresados como $\mu\text{mol trolox/g}$ biomasa.

4.5.5. *Determinación de fenoles y flavonoides totales*

La determinación de fenoles totales del extracto acuoso se realizó en 4 réplicas de acuerdo con la metodología propuesta por Singleton y Rossi (1965) y los resultados fueron expresados como

equivalentes de ácido gálico (%). En cuanto a la determinación de flavonoides totales se utilizó el protocolo descrito por Chang y colaboradores (2002) y los resultados fueron expresados como equivalentes de quercetina (%).

4.6. Bioensayo de actividad fungicida

Los extractos (tratamientos) se utilizaron en las siguientes concentraciones (% m/v): extracto acuoso 0.03 (EP1) y 0.33 (EP2), extracto de metanol 0.31 (EM2) y 0.11 (EM1) y extracto de acetona 0,05 (EA1) y 0.03 (EA2).

La prueba de inhibición se realizó mediante el método de dilución en agar utilizado por Abdel y colaboradores (2015), con algunas modificaciones: Se agregaron los extractos al medio PDA fundido y esterilizado. Se vertieron aproximadamente 10 ml de medio PDA modificado en placas de Petri con 4 réplicas cada tratamiento. El control negativo de los tratamientos incluía agua destilada autoclavada y metanol respectivamente en la misma proporción utilizada para la preparación del medio PDA modificado. Adicionalmente, se incluyó un control positivo que contenía PDA modificado con el pesticida sintético Anasac Captan 0.13% (% m/v) (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2- dicarboximida). Un vez solidificado el medio PDA se inocularon todas las placas con el hongo *B. cinerea*. Se utilizó una punta de micropipeta estéril de 1 ml invertida como molde para obtener un inóculo cilíndrico de micelio de 8 mm de diámetro y 3 mm de alto aproximadamente. El molde se insertó en un cultivo de *B. cinerea* en medio PDA y con la ayuda de una espátula estéril se depositó el inóculo en el centro de las placas con los tratamientos.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se determinó aplicando la fórmula de Abdel y colaboradores (2015):

$$\text{Inhibición del crecimiento micelial (\%)} = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

Donde: D1 = diámetro del crecimiento micelial del hongo sin tratamiento expresado en mm y D2 = diámetro del crecimiento micelial del hongo en tratamiento expresado en mm.

Las mediciones de crecimiento micelial se realizaron transcurridas 48, 66 y 120 horas desde el inicio del ensayo o hasta que el micelio del hongo creciendo en el tratamiento o su respectivo control alcanzaba el borde de la placa.

4.7. Identificación taxonómica

4.7.1. *Análisis molecular*

El ADN total de la cianobacteria CCM-UdeC 219 fue extraído de 5 ml de un cultivo de 15 días, de acuerdo con la metodología utilizada por Gómez y González (2001). La región ITS 16S–23S fue amplificada utilizando los partidores 16S3'F (TGYGGCTGGATCACCTCCTT) y 23S5'R (TCTGTGTGCCTAGGTATCC) como en Scheldeman y colaboradores (1999). La composición de la reacción de PCR y el programa de amplificación se realizaron de acuerdo con Scheldeman y colaboradores (1999). La purificación de los fragmentos amplificados se realizó usando el kit de purificación “Wizard SV and PCR Clean-Up System” (PROMEGA, USA). Las muestras se enviaron a secuenciar mediante secuenciación automática en la empresa AustralOmics, Valdivia, utilizando los mismos partidores utilizados en el PCR.

4.7.2. *Análisis morfológico*

Se utilizaron cultivos de la cepa creciendo en los medios: BG-11, BG11(GT), Watanabe y Spirulina. Para la descripción se fotografiaron tricomas y se midió la longitud y ancho de las células vegetativas, heterocistos, acinetos y células terminales utilizando un microscopio óptico con cámara fotográfica integrada y el software de análisis de imágenes ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Las mediciones se realizaron en los cultivos creciendo en diferentes medios de cultivo con 5 y 15 días de antigüedad.

5. RESULTADOS

5.1. Crecimiento del cultivo

Al crecer sin aireación constante la auto-floculación del cultivo ocurre rápidamente (30 minutos aproximadamente) (Figura 1). El cultivo es de color verde azulado, aunque, en cultivos creciendo en medio con deficiencia de hierro se torna de color verde pálido. La cepa CCM-UdeC 219 presenta gránulos oscuros en su citoplasma.

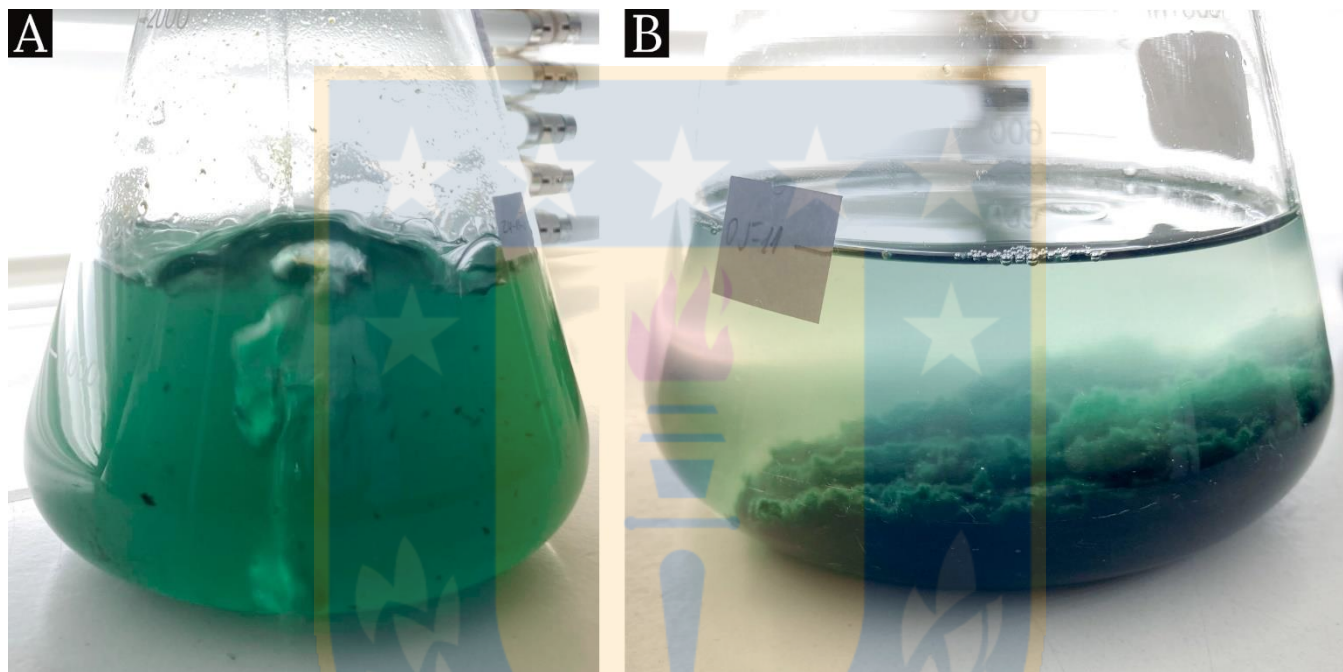


Figura 1. Auto-floculación en cultivos de la cepa CCM-UdeC 219: A: cultivo con aireación constante y B: cultivo sin aireación constante.

En la Figura 2 se muestra la cepa CCM-UdeC 219 creciendo en medio BG-11, con aireación, durante el periodo de aclimatación inicial del cultivo.

En las réplicas cultivadas en medio BG-11 la duración del crecimiento en fase exponencial fue de 15 días desde la inoculación, luego se mantuvo en fase estacionaria 2 días hasta el término del experimento (Figura 3). La tasa de crecimiento fue 0.56 (divisiones/día) y la densidad máxima alcanzada por el cultivo en fase estacionaria fue 804.9 ± 48 μg clorofila a/L. En cuanto al crecimiento de la cepa en medio BG-11 (GT), el crecimiento en fase exponencial se inició retardado 4 días aproximadamente, una vez aclimatado a las condiciones de deficiencia de hierro que impone este medio de cultivo, la fase exponencial de crecimiento se extendió 15 días

al igual que las réplicas creciendo en BG-11 (Figura 4) La tasa de crecimiento fue 0.49 (divisiones/día) y la densidad máxima alcanzada por el cultivo en fase estacionaria fue 486 μg clorofila a/L. Los resultados de peso seco y concentración de clorofila (a) en fase estacionaria indican que el rendimiento en términos de biomasa por volumen de cultivo se mantuvo estable en ambos casos, no obstante, la concentración de clorofila (a) fue notablemente menor en el cultivo creciendo en BG-11 (GT) (Figura 5). Por otro lado, la cianobacteria se escaló hasta 18 litros en medio BG-11 (GT) y demostró ser capaz de continuar creciendo y mantenerse en buenas condiciones hasta 30 días aproximadamente después de alcanzar su máxima densidad.



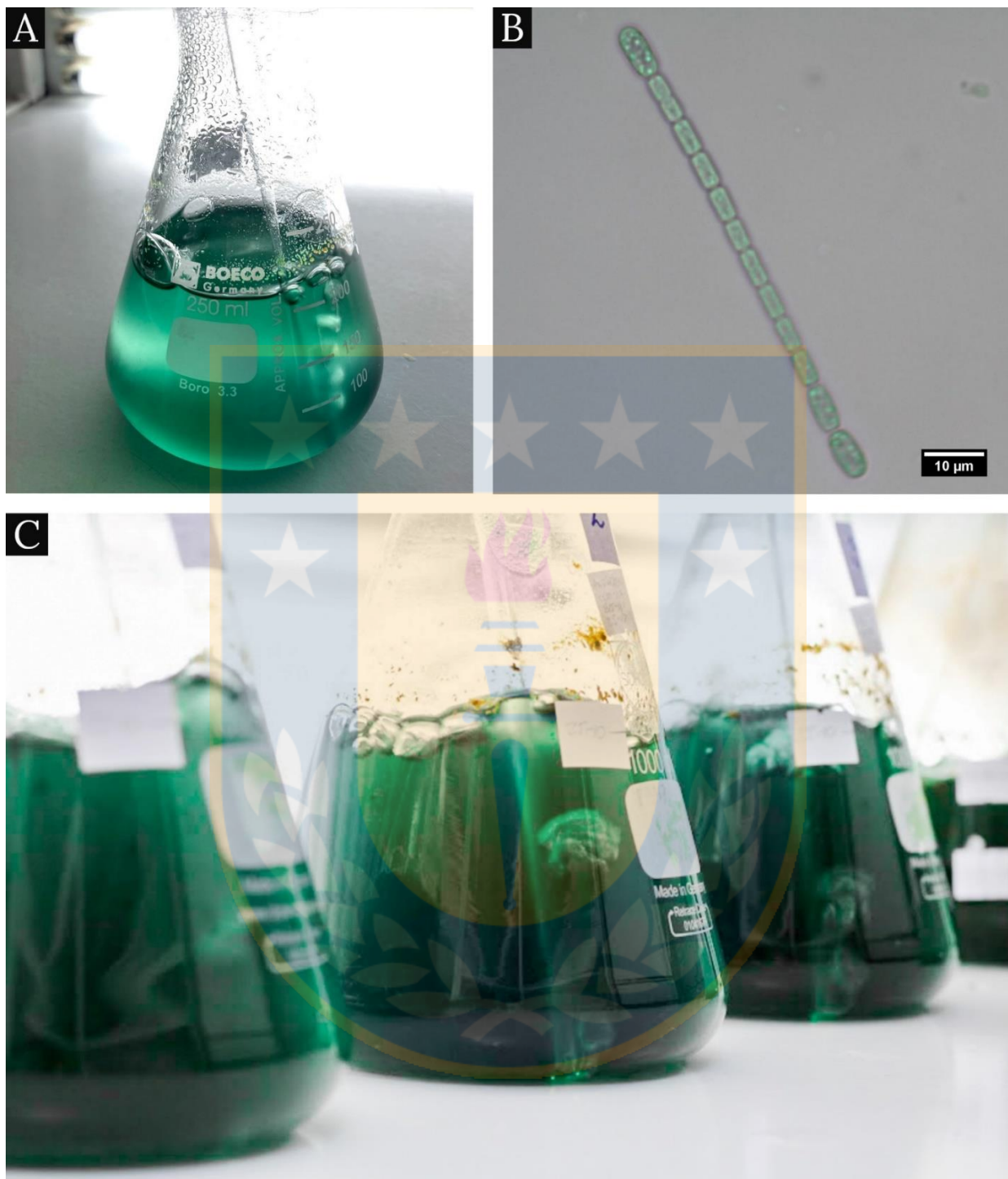


Figura 2. Aclimatación y cultivo de la cepa CCM-UdeC 219: A: matraz con cultivo aclimatado que se utilizó para inocular las réplicas, B: cepa CCM-UdeC 219 creciendo en medio BG-11 observada bajo el microscopio óptico y C: réplicas cultivadas en medio BG-11 utilizadas para la

construcción de las curvas de crecimiento, análisis de composición bioquímica, preparación de extractos y determinación de la capacidad antioxidante.

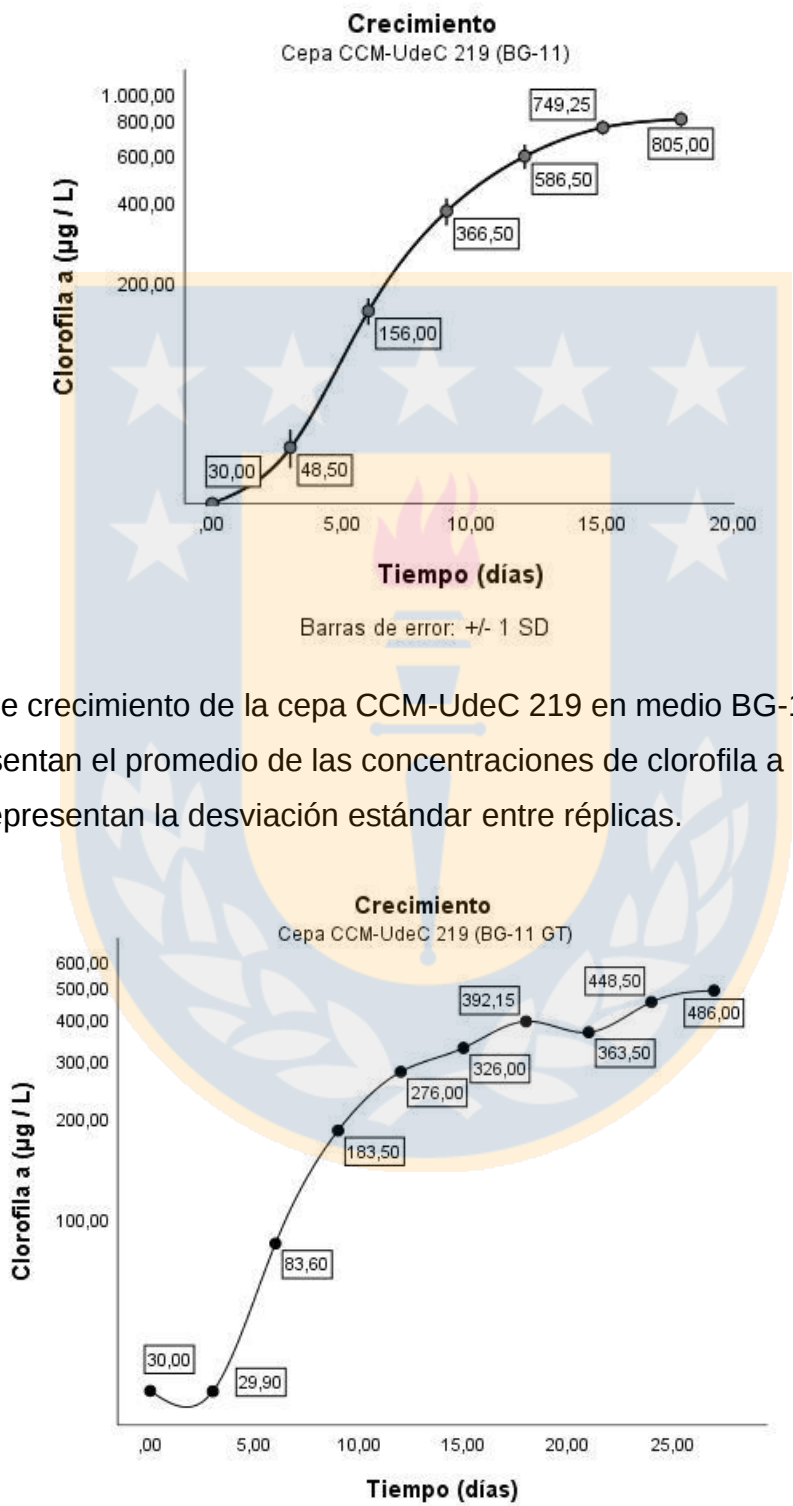


Figura 3. Curva de crecimiento de la cepa CCM-UdeC 219 en medio BG-11. Los valores en los cuadrados representan el promedio de las concentraciones de clorofila a de las 4 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre réplicas.

Figura 4. Curva de crecimiento de la cepa CCM-UdeC 219 en medio BG-11 (GT), los datos de la curva corresponden a una réplica.

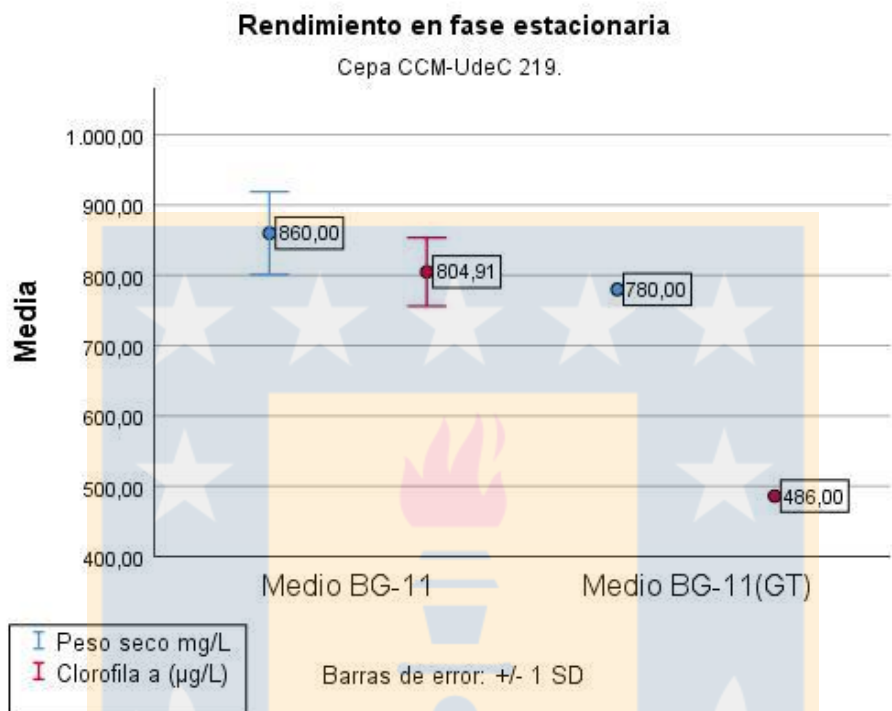


Figura 5. Determinación de peso seco y concentración de clorofila (a) del cultivo de la cepa CCM-UdeC 219 durante la fase estacionaria (día de la cosecha de los cultivos), las barras de error representan la desviación estándar de 4 réplicas.

5.2. Composición bioquímica y actividad antioxidante

Los resultados del análisis de composición bioquímica revelaron diferencias entre la biomasa creciendo en medio BG-11 (Figura 6) y BG-11 (GT). La concentración de clorofila (a), fue mayor en la biomasa proveniente del medio BG-11 en una proporción similar a la que se determinó directamente en los cultivos durante la fase estacionaria: 10.1 y 4.7 µg/mg respectivamente (Tabla 1). En cuanto a la capacidad antioxidante, la biomasa proveniente del medio BG-11 (GT) exhibió una mayor capacidad antioxidante que en el medio BG-11: 41.1 y 31.8 µmol trolox/g respectivamente (Tabla 1). Por otro lado, el extracto acuoso exhibió un valor de capacidad antioxidante significativamente mayor que la biomasa liofilizada (152.4 µmol trolox/g).

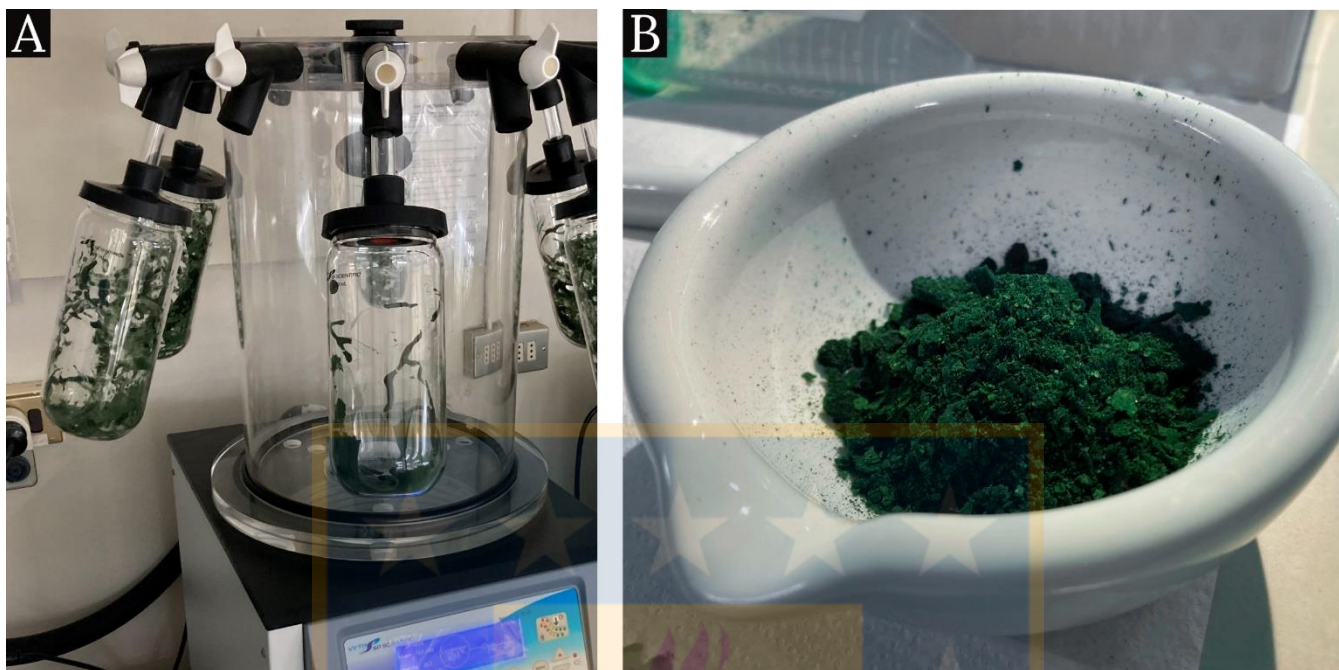


Figura 6. Liofilización de biomasa de la cepa CCM-UdeC 219: A: liofilizador marca Virtis con 6 botellas conteniendo la biomasa a secar y B: biomasa liofilizada y molida en mortero.

El contenido de proteínas de la biomasa de la cepa CCM-UdeC 219, disminuyó sustancialmente al ser cultivada en medio de cultivo grado técnico (BG-11(GT)), el cual tenía deficiencia de hierro, en comparación con la biomasa obtenida desde el cultivo que creció en medio BG-11: 21.8 y 41.2% respectivamente (Tabla 1). En cuanto al extracto acuoso, el contenido de proteínas fue levemente superior (46%).

El contenido de pigmentos ficobilínicos y compuestos carotenoides en la biomasa no sufrió variaciones en cultivos creciendo en ambos medios (medio BG-11 vs BG-11 (GT)), mientras que, el contenido de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina se incrementó sustancialmente en el extracto acuoso (Tabla 1). Por otro lado, se determinó que cerca del 10% del extracto acuoso correspondía a carbohidratos y que una pequeña proporción, cercana al 0.1% del extracto, corresponde a compuestos fenólicos (Tabla 1): la concentración de fenoles y flavonoides en el extracto acuoso fue de 0.054 y 0.052 equivalentes de ácido gálico (%) y equivalentes de quercetina (%) respectivamente.

Tabla 1. Composición bioquímica y capacidad antioxidante del extracto acuoso y biomasa, de la cepa CCM-UdeC 219 creciendo en medio de cultivo BG-11 y BG-11 (GT). * Valores promedio $\pm$ desviación estándar de cuatro réplicas.

	Unidad	Extracto acuoso*	Biomasa BG-11(GT)	Biomasa BG-11*
Capacidad antioxidante	$\mu\text{mol trolox/g}$	$152,461 \pm 6,3$	41,13	$31,882 \pm 6,9$
Clorofila a	$\mu\text{g/mg}$	-	4,743	$10,146 \pm 1,0$
Carotenoides	$\mu\text{g/mg}$	-	2,301	$2,542 \pm 0,3$
Ficocianina	%	$17,073 \pm 1,5$	3,915	$3,375 \pm 0,3$
Aloficocianina	%	$5,730 \pm 1,2$	2,303	$2,314 \pm 0,2$
Ficoeritrina	%	$2,404 \pm 0,6$	0,971	$1,127 \pm 0,1$
Proteínas totales	Eq. de BSA (%)	$46,026 \pm 3,3$	21,80	$41,222 \pm 2,0$
Carbohidratos	Eq. de glucosa (%)	$10,410 \pm 1,0$	-	-
Fenoles	Eq. de ácido gálico (%)	$0,054 \pm 0,016$	-	-
Flavonoides	Eq. de quercetina (%)	$0,052 \pm 0,004$	-	-

5.3. Bioensayo de actividad fungicida

El hongo *B. cinerea* creció rápidamente al ser cultivado en medio PDA, la formación de esclerocios es evidente luego de que los cultivos cubrían toda la placa de Petri (Figuras 7 & 8).



Figura 7. Cepa de *B. cinerea* utilizada en este estudio cultivada en medio PDA, contorno del inoculo presenta formación de estructuras con micelio compactado (esclerocios). Los orificios

que presenta el medio de cultivo corresponden a los nuevos inóculos utilizados para los repiques y bioensayos.

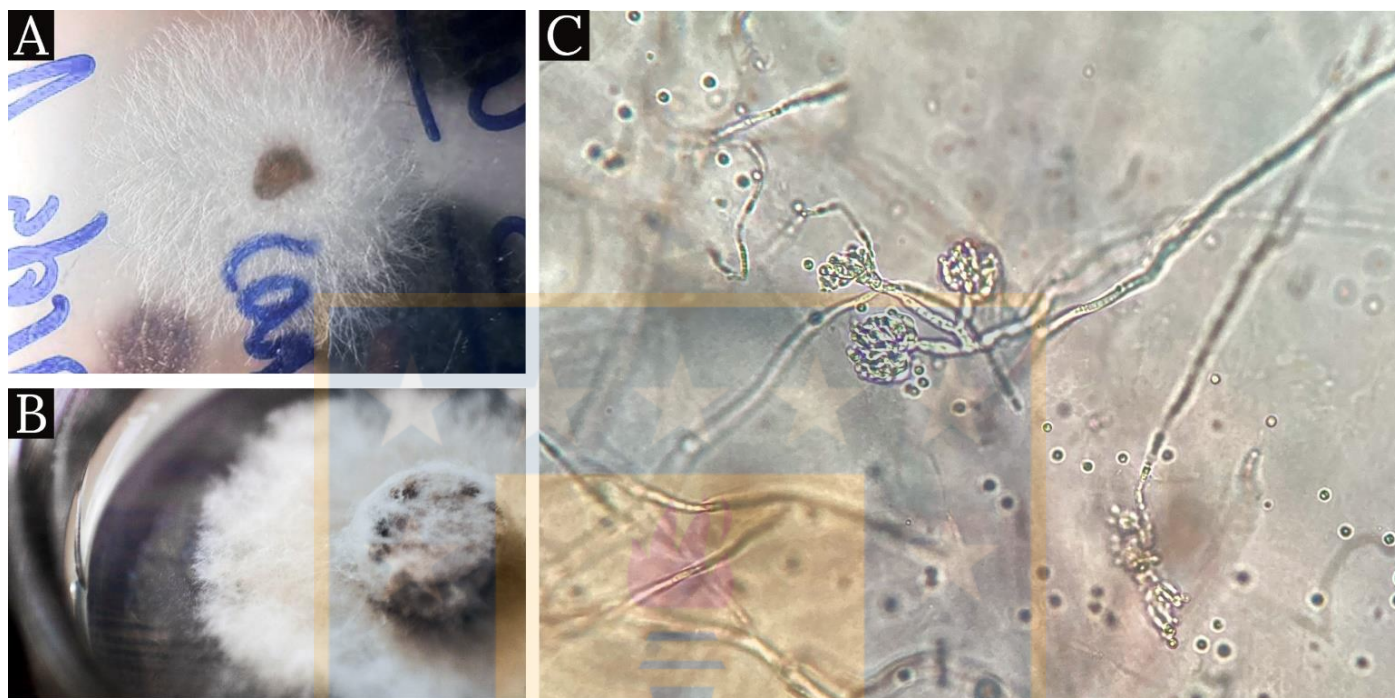


Figura 8. Cepa del hongo fitopatógeno *B. cinerea* utilizado en este estudio: A-B: hongo creciendo en medio PDA y C: micelio y conidióforos observados bajo el microscopio óptico.

En la Figura 9 se muestra el proceso de obtención de los extractos de acetona y metanol mediante extracción pasiva. El extracto de metanol mostró un color más oscuro que el de acetona evidenciando una mayor eficiencia extractiva de este solvente sobre la biomasa de la cepa CCM-UdeC 219 (Fig 9, B y C).

Los extractos obtenidos con metanol inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* y la eficiencia de los tratamientos varió a medida que transcurría el tiempo: el efecto de la inhibición fue mayor a las 66 horas desde el inicio del ensayo (Figura 10), donde: EM1 y EM2 inhibieron el crecimiento del hongo fitopatógeno un 65 y 56% respectivamente, mientras que en las primeras 48 horas y al finalizar el ensayo, el efecto inhibitorio de los tratamientos fue menor: cercano a un 38%.

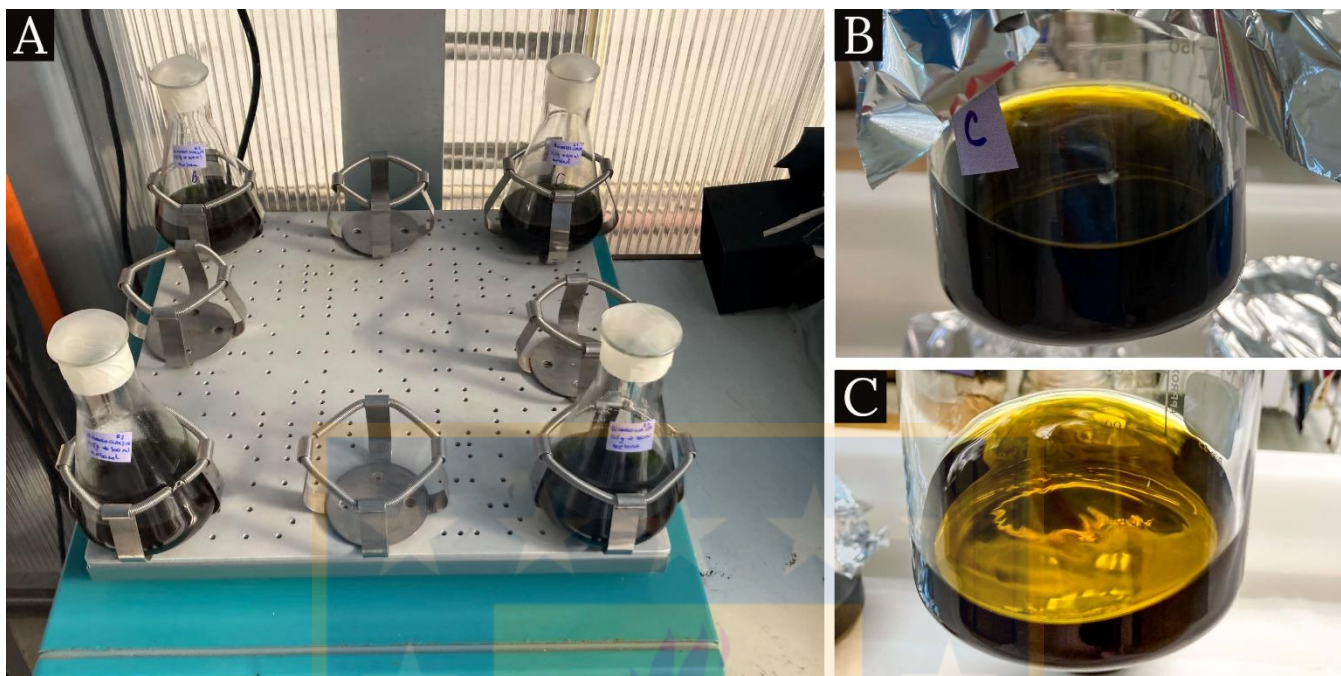


Figura 9. Preparación de extractos de metanol: A: agitador orbital, B: matraz con extracto de metanol y C: matraz con extracto de acetona.

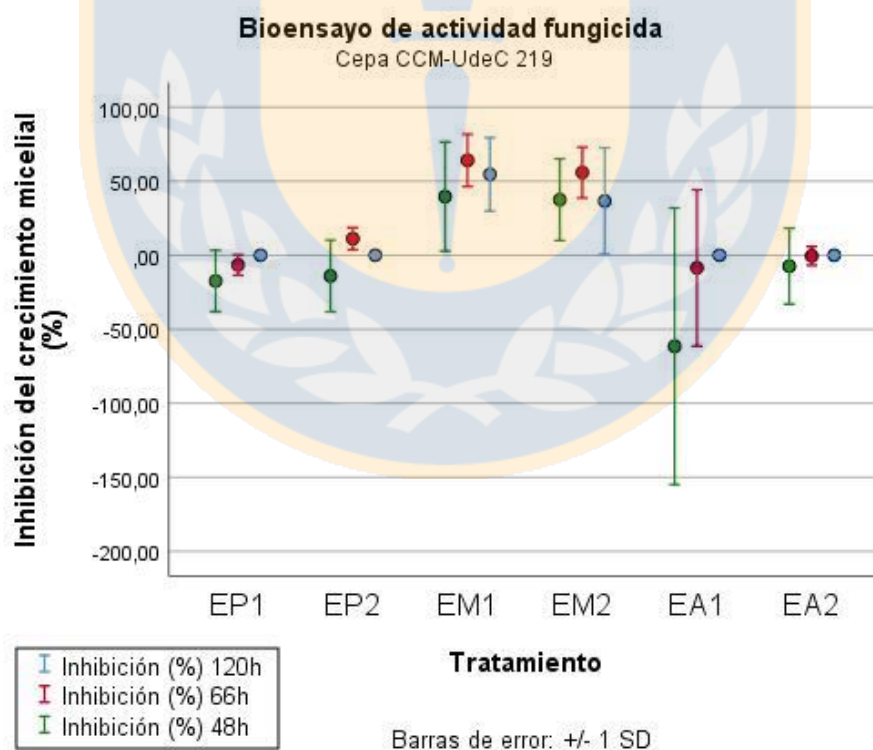


Figura 10. Bioensayo de actividad fungicida de los extractos acuosos (EP1 y EP2), extractos de acetona (EA1 y EA2) y extractos de metanol (EM1 y EM2) obtenidos desde la cepa CCM-UdeC 219. Las barras de error representan la desviación estándar de 4 réplicas.

En la Figura 11 se muestra el aspecto del extracto acuoso, previo a su liofilización, evidenciando un intenso color azul, debido a la presencia de ficocianina y aloficocianina. Al contrario de lo esperado, los extractos acuosos favorecieron el crecimiento de *B. cinerea*. Los tratamientos EP1 y EP2 potenciaron el crecimiento del hongo a las 48 horas: 17 y 14% respectivamente (Figura 10). Luego, transcurridas 66 horas, el tratamiento EP1 potenció al hongo un 7%, mientras que EP2 inhibió el crecimiento del hongo un 11%. Las mediciones de crecimiento micelial del hongo en los tratamientos EP1 y EP2 finalizaron a las 66 horas, cuando el micelio del hongo alcanzó el borde de la placa. En cuanto a los extractos de acetona: EA1 y EA2 potenciaron el crecimiento de *B. cinerea* a las 48 y no mostraron efecto a las 66 horas (Figura 10). Las placas EA1 y EA2 sufrieron contaminación bacteriana y fúngica, además, las mediciones de crecimiento micelial radial de *B. cinerea* creciendo con EA1 y EA2 fueron imprecisas (Figura 10), ya que el hongo creció de forma irregular.

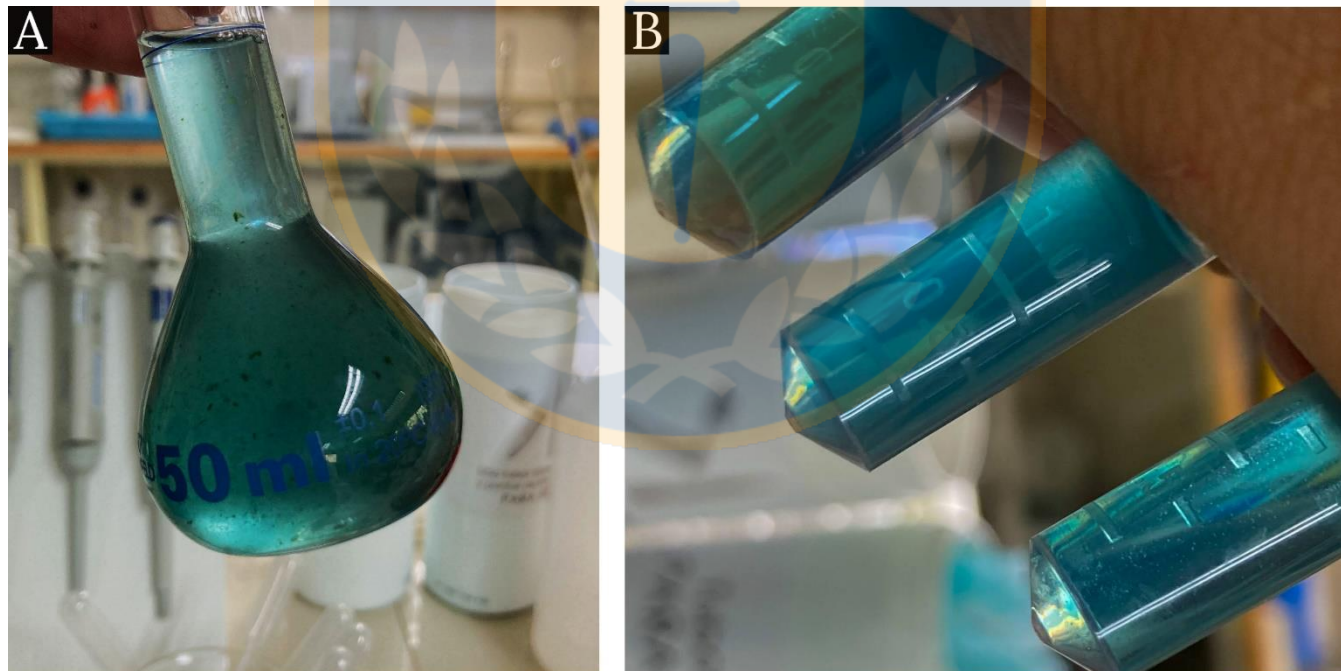


Figura 11. Extracto acuoso proveniente de la biomasa de la cepa CCM-UdeC 219 previo a su liofilización: A: matraz aforado con extracto acuoso sin centrifugar y B: tubos eppendorf con extracto acuoso centrifugado.

El crecimiento del hongo fue inhibido un 100% por el pesticida sintético Anasac Captan 0.13% durante las primeras 120 horas, no obstante, durante los días siguientes el hongo *B. cinerea* mostró ser resistente al pesticida sintético y creció en las placas “control positivo”, superando en términos de crecimiento micelial, al cultivo tratado con EM1 (Figura 12). Este último resultado requiere ser confirmado. Se identificaron contaminantes fúngicos y bacterianos en las placas con el tratamiento EM1 a siete días desde el inicio del bioensayo (Figura 12).



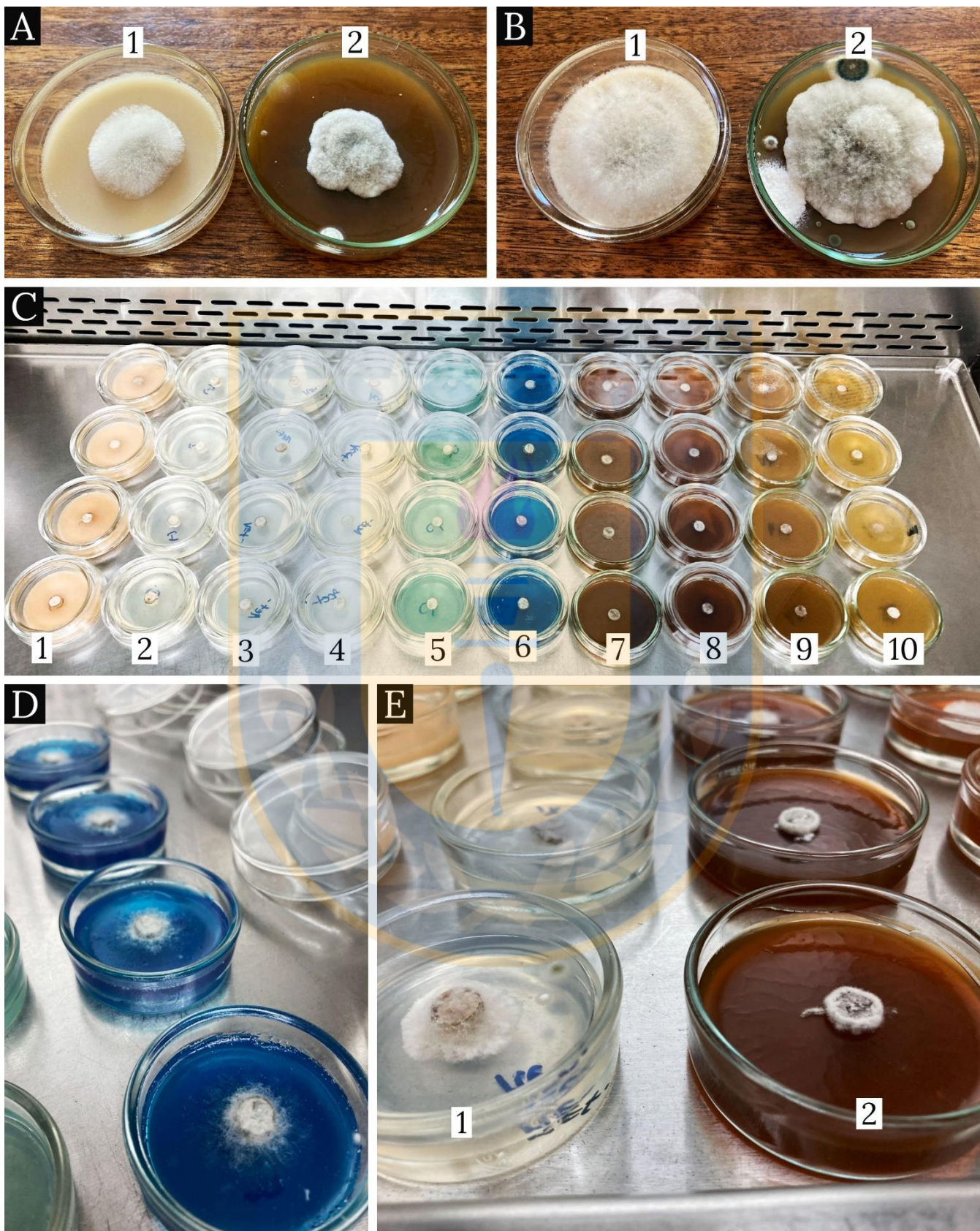


Figura 12. Bioensayo de actividad fungicida: A: control positivo Anasac Captan (1) y EM1 (2) a 7 días desde el inicio del bioensayo; B: control positivo Anasac Captan (1) y EM1 (2) a 12 días desde el inicio del bioensayo; C: réplicas control positivo Anasac Captan (1), réplicas control negativo agua destilada (2), réplicas control negativo metanol (3), réplicas control negativo acetona (4), réplicas EP1 (5), réplicas EP2 (6), réplicas EM1 (7), réplicas EM2 (8), réplicas EA1 (9) y réplicas EA2 (10); D: EP2 a las 48 horas desde el inicio del ensayo y E: EM1 (2) con su respectivo control negativo de metanol (1).

5.4. Identificación taxonómica

5.4.1. Caracterización morfológica

Se midieron en total 1.525 células vegetativas, 105 heterocistos, 69 acinetos y 78 células terminales (Tabla 2). La cepa presenta variaciones morfológicas, morfométricas y de desarrollo del tricoma al ser cultivada en diferentes condiciones de nutrientes (Tabla 2 & Figura 13).

Las células vegetativas habitualmente presentan constricciones en su pared y son aproximadamente 2 veces más largas que anchas. La longitud de las células vegetativas es uno de los caracteres morfológicos más variables (Tabla 2). Por otro lado, el ancho de las células vegetativas se mantuvo estable en cultivos creciendo en diferentes medios.

Las células terminales son mayoritariamente cónicas y ocasionalmente redondeadas, además, presentan longitud variable entre cultivos creciendo en diferentes condiciones de nutrientes, de igual forma ocurre entre individuos creciendo en el mismo medio de cultivo.

Los heterocistos son solitarios y se disponen frecuentemente de forma equidistante entre cadenas de acinetos (acinetos apoheterocíticos) y son de forma ovalada (Figura 14). No se observaron heterocistos en tricomas creciendo en medio BG-11 (Figura 13), pero si se desarrollaron en tricomas creciendo en medio BG-11 (GT). La longitud de los heterocistos es un carácter que presenta variabilidad en cultivos creciendo en diferentes condiciones. Del mismo modo que ocurre con el ancho de las células vegetativas, el ancho de los heterocistos se mantiene relativamente estable entre diferentes cultivos (Tabla 2).

Los acinetos por su parte se pueden observar ocasionalmente con forma esférica y mayoritariamente ovalada (Figuras 13 & 14). No se observaron acinetos en tricomas creciendo en medio Spirulina. La medida de largo de los acinetos es un carácter que presenta una gran

variabilidad pero que se mantiene relativamente estable entre diferentes cultivos, contrario a lo que ocurre con las medidas de ancho de los acinetos (Tabla 2).

Tabla 2. Medidas citomorfométricas de la cepa CCM-UdeC 219 creciendo en diferentes medios de cultivo, los valores de error corresponden a la desviación estándar del total de células medidas por tipo y tratamiento.

Medio de cultivo	Células vegetativas		Heterocisto		Acineto		Largo célula terminal (μm)
	Ancho (μm)	Largo (μm)	Ancho (μm)	Largo (μm)	Ancho (μm)	Largo (μm)	
Spirulina	1,98 - 3,68 (± 0,29)	1,52 - 5,90 (± 0,71)	3,35 - 4,39 (± 0,28)	6,21 - 9,57 (± 0,96)	-	-	2,79 - 6,56 (± 0,93)
BG-11	1,24 - 3,13 (± 0,25)	1,92 - 6,79 (± 0,81)	-	-	2,56 - 3,22 (± 0,29)	3,50 - 9,84 (± 2,69)	3,49 - 7,16 (± 1,00)
BG-11 (GT)	2,56 - 3,84 (± 0,28)	3,74 - 7,24 (± 0,87)	3,99 - 6,83 (± 0,63)	4,71 - 8,70 (± 1,11)	4,16 - 5,87 (± 0,57)	6,47 - 10,01 (± 0,96)	3,06 - 8,81 (± 1,85)
Watanabe	1,79 - 3,51 (± 0,23)	2,39 - 6,59 (± 0,79)	2,49 - 5,74 (± 0,54)	3,44 - 8,09 (± 0,89)	3,14 - 7,50 (± 0,73)	4,88 - 9,48 (± 1,02)	5,24 - 6,58 (± 0,51)

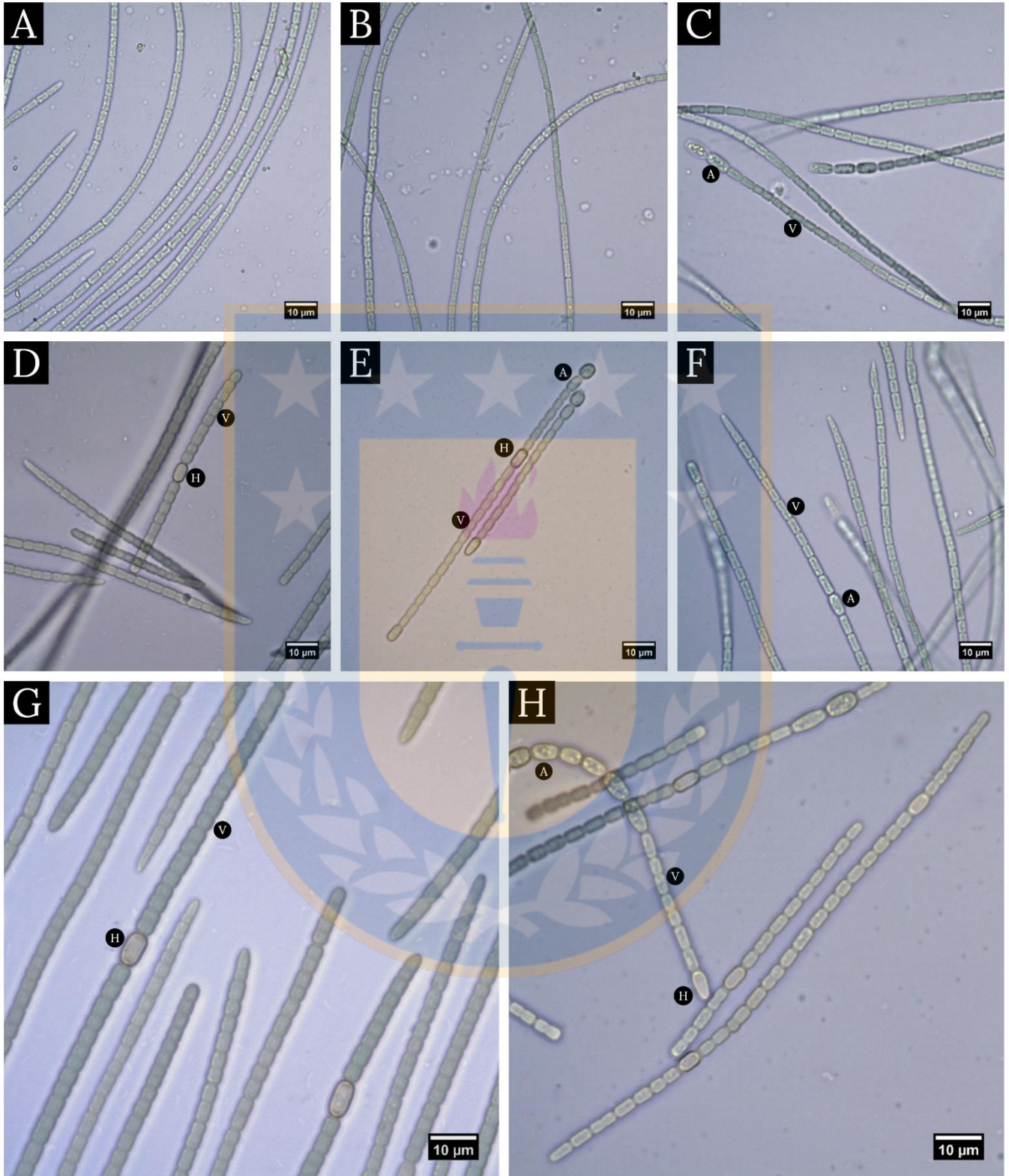


Figura 13. Observaciones bajo el microscopio de la cepa CCM-UdeC 219 creciendo en diferentes medios de cultivo: A – B: medio BG-11, C – F: medio BG-11 (GT), D – G: medio Spirulina y E – H: medio Watanabe. A: acineto, V: células vegetativas y H: heterocistos

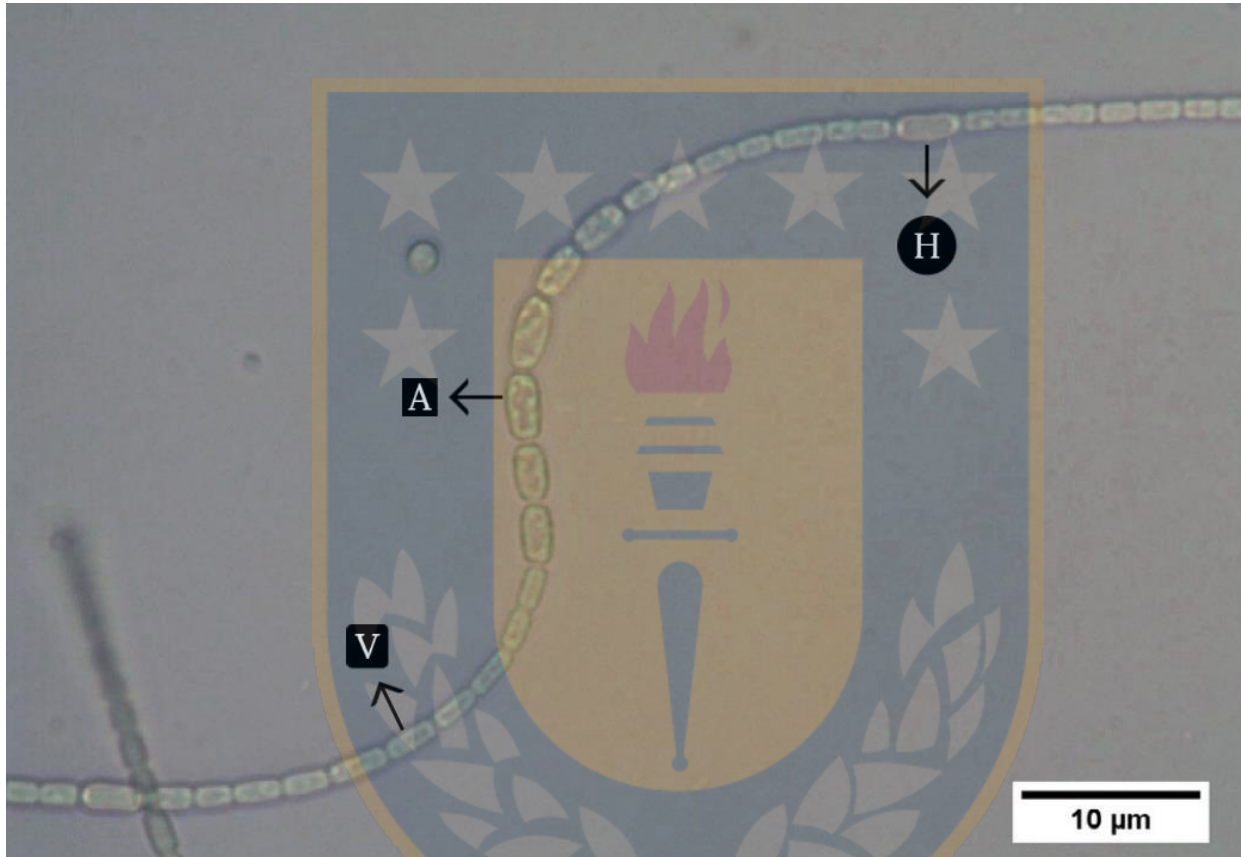


Figura 14. Cepa CCM-UdeC 219 creciendo en medio Watanabe: A: acineto apoheterocítico, V: células vegetativas y H: heterocistos.

5.4.2. *Análisis molecular*

El análisis de la región ITS del ARNr 16S–23S en la cepa CCM-UdeC 219 mostró resultados inespecíficos al ser comparada mediante BLAST (NCBI) con las secuencias depositadas en el Genbank. El análisis cualitativo del producto de PCR reveló la amplificación de tres bandas de 800, 600 y 400 pb aproximadamente (Figura 15). La banda de producto PCR más tenue (menos abundante) fue atribuida a la presencia de contaminantes bacterianos en el cultivo utilizado para

la extracción de ADN total, por consiguiente, se secuenció únicamente el producto PCR más abundante (Figura 16). A pesar de estas limitaciones, sobre la base de las secuencias que obtuvimos, encontramos que la secuencia *forward* de la cepa CCM-UdeC 219 (Figura 17) mostró un 92% de identidad con la cepa *Anabaena* sp. SAG12.82 (Nostocaceae) (ID: KT290322.1); un 91% de identidad con la cepa *Trichormus* sp. SBC124 (Nostocaceae) (ID: MW403966.1) y presentó 61 coincidencias (con menor porcentaje de identidad y cobertura) con el género *Nodularia* (Aphanizomenonaceae).



Figura 15. Gel de agarosa con productos de PCR región ITS utilizando los partidores 16S3'F y 23S5'R: A: gel con marcador 200 bp DNA Ladder (A – 1) y muestra con producto PCR antes de purificar (A – 2); B: gel con Marcador AccuRuler 100 bp plus DNA Ladder (B – 1) y producto PCR purificado (B – 2).

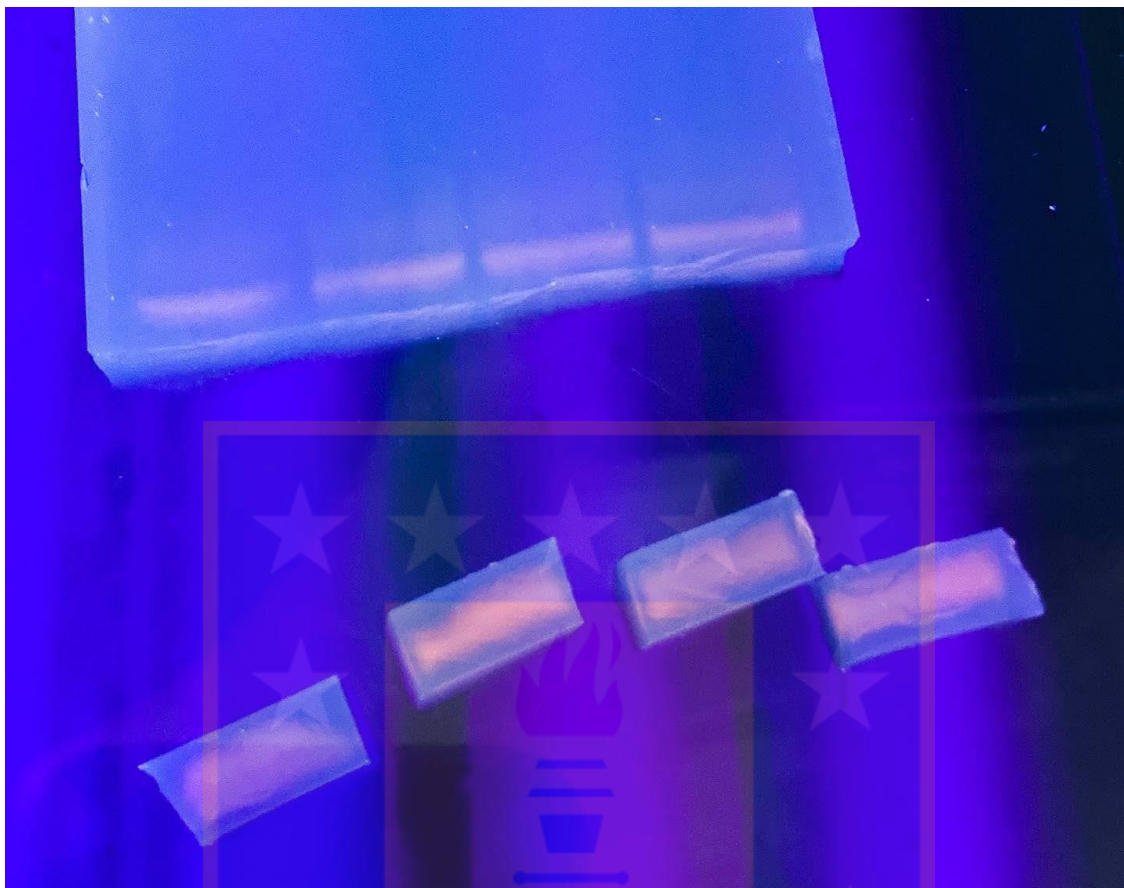


Figura 16. Bandas aisladas desde el gel de agarosa preparativo para su posterior purificación y secuenciación.

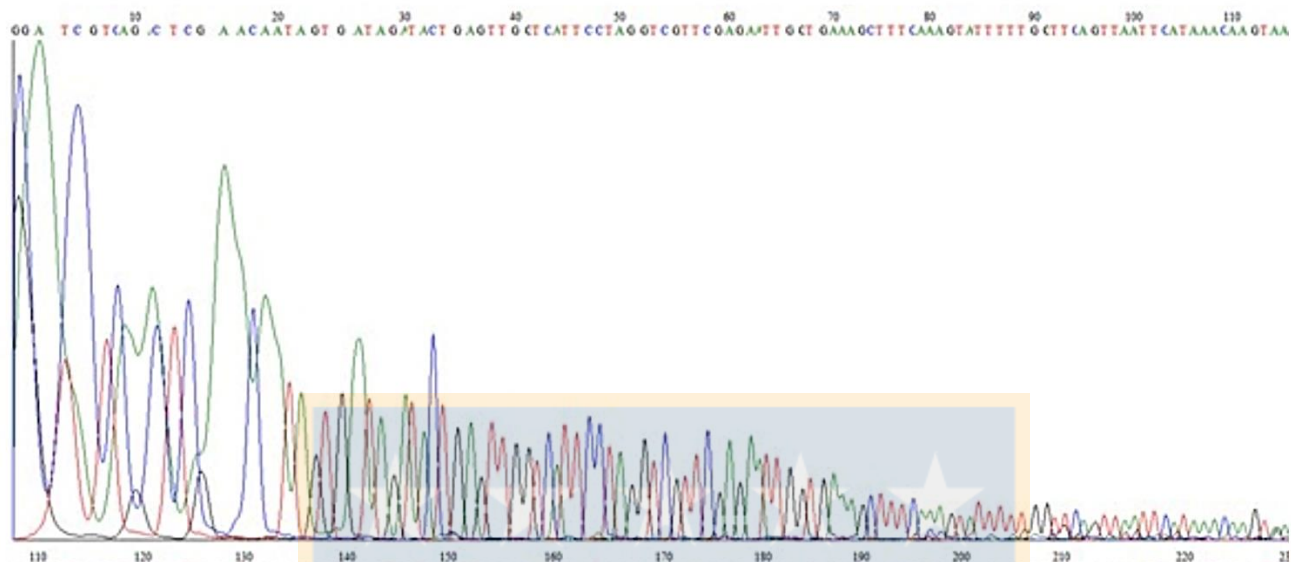


Figura 17. Electroferograma de la secuencia *forward* de la región ITS de la cepa CCM-UdeC 219 obtenida por secuenciación automática.

6. DISCUSIÓN

6.1. Atributos de crecimiento

La sobrevivencia de las cianobacterias desde su aparición hasta la actualidad no ha estado exenta de fuertes limitaciones de disponibilidad de hierro en su ambiente natural (Cheng & He, 2020), por lo que han desarrollado variadas estrategias que les permiten optimizar la adquisición y utilización del hierro, como la sustitución de proteínas involucradas en la fotosíntesis por proteínas homólogas que no dependen del hierro para su biosíntesis (Kunui & Singh, 2020). Esto puede explicar la aclimatación de la cepa CCM-UdeC 219 a un medio de cultivo con deficiencia de hierro como el BG-11 (GT) utilizado en este estudio. La reducción de la concentración de clorofila (a) en cultivos con limitación de hierro observada en este estudio (Figura 5), ha sido reportada en especies de cianobacterias anteriormente y la disminución en la pigmentación celular se debería a la afectación de la síntesis basada en vías metabólicas dependientes de hierro de los principales complejos ficobilínicos captadores de luz (Guikema & Sherman, 1983; Ivanov *et al.*, 2000). Este hallazgo supone una ventaja de la cepa CCM-UdeC 219 desde la perspectiva biotecnológica, ya que, el escalamiento de cultivos microalgales a nivel industrial requiere muchas veces la sustitución de nutrientes en los medios de cultivo por

otros de menor pureza e incluso, la supresión de algunos de ellos, como consecuencia de su elevado costo o no disponibilidad de reactivos en su versión de grado técnico.

6.2. Composición bioquímica

Diversos investigadores han investigado el rol de la expresión de los genes *isiA* e *isiB* en cianobacterias que se ven enfrentadas a condiciones de deficiencia de hierro, sin embargo, se demostró que *isiA* e *isiB* también son inducidos por estrés oxidativo, lo que sugiere que las cianobacterias desafiadas por limitación de hierro podrían sufrir estrés oxidativo, que sería además un inductor de la expresión de *isiA*, para combatir el estrés oxidativo. Se ha demostrado que las células cultivadas en condiciones de agotamiento de hierro inducen la expresión de un gen que codifica la peroxidasa peroxirredoxina PrxQ-A (Kunui & Singh, 2020), lo que podría explicar la estimulación de la respuesta antioxidante la cepa CCM-UdeC 219 creciendo en medio BG-11 (GT) (Tabla 1 y Figura 13) con limitación de hierro y en consecuencia una mayor actividad antioxidante de la respectiva biomasa liofilizada. Por otro lado, Michael y colaboradores (2018), determinaron que la concentración de moléculas antioxidantes como fenoles, flavonoides y carotenos en extractos de *Arthrospira fusiformis* se incrementa significativamente al ser cultivada en medio de cultivo *low-cost* y atribuyeron la diferencia, al estrés producido por el incremento de pH en el medio de cultivo preparado con nutrientes en su grado técnico. En nuestro estudio no se midió el pH de los medios de cultivo; no obstante, la utilización de reactivos de grado técnico y la supresión del componente ácido cítrico en el medio BG-11 (GT) puede sugerir una diferencia de pH significativa entre ambos cultivos y permite explicar desde otro punto de vista el incremento de la actividad antioxidante en la biomasa de la cepa CCM-UdeC 219 proveniente de este medio de cultivo en particular (Tabla 1).

La ficocianina es un antioxidante natural producido por las cianobacterias que ha sido ampliamente estudiado debido a que representa una alternativa a los antioxidantes sintéticos comunes (Ismaiel *et al.*, 2014). Varios estudios indican que algunas cepas de *Spirulina*, *Geitlerinema*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Arthrospira* han demostrado ser excelentes fuentes de antioxidantes y sus autores atribuyen su actividad a un alto contenido de pigmentos ficobilínicos en los extractos acuosos y biomasa (Ismaiel *et al.*, 2014; Hossain *et al.*, 2016; Renugadevi *et al.*, 2018; López *et al.*, 2021). En la misma línea, el trabajo realizado por Hajimahmoodi y colaboradores (2009) tuvo por objetivo evaluar las propiedades antioxidantes de 12 cepas de

microalgas de diferentes grupos y determinó que las cianobacterias en particular cepas de *Fischerella ambigua*, e incluso, clorófitas como: *Chlorella vulgaris*, pueden encontrar importantes y amplias aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria debido a su alta actividad antioxidante. Este último hallazgo nos llama particularmente la atención, ya que utilizando la misma metodología de determinación de capacidad antioxidante y semejante preparación de los extractos acuosos, la cepa CCM-UdeC 219 incluida en este estudio (Figura 11) supera hasta cinco veces la capacidad antioxidante reportada para *F. ambigua* y *C. vulgaris* (Tabla 1), lo que nos permite sugerir que la cepa CCM-UdeC 219 pueden ser consideradas una buena fuente de antioxidantes naturales, cuyas aplicaciones en la industria agrícola y alimentaria deben ser estudiadas en futuras investigaciones. Por otro lado, algunos pigmentos ficobilínicos como la c-ficocianina producidos por cianobacterias son ampliamente estudiados debido a sus propiedades nutraceuticas (Eriksen, 2008). La cianobacteria *Arthrospira platensis* es considerada una excelente fuente de c-ficocianina y proteínas, por esta razón, en la actualidad es cultivada y comercializada como suplemento alimenticio (Nuhu, 2013). En nuestro estudio pudimos determinar que la composición de pigmentos ficobilínicos de la cepa CCM-UdeC 219 es sustancialmente menor en comparación con algunas cepas de *Arthrospira*. En el trabajo de López y colaboradores (2021), se determinó la composición bioquímica de dos cepas de *Arthrospira* mediante una metodología equivalente a la utilizada en nuestro trabajo y precisaron que la ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina representaba cerca del 10, 14 y 4% de la biomasa seca de la cepa respectivamente, un valor que supera hasta 3 veces la composición de pigmentos ficobilínicos de la cepa CCM-UdeC 219.

La deficiencia de hierro induce la disminución del número de ficobilisomas: complejos multiproteicos compuestos principalmente de ficobiliproteínas, que pueden representar hasta el 60% del contenido de proteínas hidrosolubles en algunas microalgas (Gantt, 1981). Lo anterior podría explicar parcialmente el reducido contenido de proteínas de la biomasa obtenida desde el cultivo creciendo en medio de cultivo con deficiencia de hierro (Tabla 1).

6.3. Bioensayo de actividad fungicida

Entre los solventes más utilizados para la extracción de moléculas con propiedades antifúngicas desde cianobacterias está el agua, metanol y acetona (Araya & Gómez, manuscrito en

preparación). Un extracto acuoso de cianobacterias contiene una alta proporción de proteínas las cuales han mostrado ser eficaces en la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos *in vitro* (Gupta *et al.*, 2013; Hemlata & Fatma, 2018). Adicionalmente, los extractos de proteínas en formulaciones de hidrolizados exhiben una actividad biológica mejorada; esto debido a que, los péptidos resultantes de la hidrólisis enzimática pueden presentar bioactividad de forma individual o actuar sinérgicamente, mejorando el efecto producido por extractos proteicos crudos (Saadi *et al.*, 2015; Soto *et al.*, 2018).

Varios investigadores han explorado las propiedades anti-fitopatógenas de especies de cianobacterias utilizando metanol como solvente para preparar los extractos utilizados en bioensayos *in vitro* y han atribuido la actividad de los extractos a la presencia de diferentes moléculas como son los compuestos fenólicos (Alara *et al.*, 2021). Algunos estudios demostraron que los extractos de metanol provenientes de algunas cepas de *Spirulina* spp. mostraron actividad fungicida moderada-fuerte sobre algunos fitopatógenos del género *Fusarium* y *Aspergillus*; los autores determinaron que la extracción de ácido c-linolénico y algunos compuestos fenólicos como el ácido gálico fueron responsables de la bioactividad de los extractos (Pagnussatt *et al.*, 2014; Scaglioni *et al.*, 2018a; Scaglioni *et al.*, 2018b; Seghiri *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2011). En este sentido, la presencia de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos EM1 y EM2 de nuestro bioensayo podría explicar la actividad fungicida sobre el hongo *B. cinerea*. Los compuestos fenólicos del extracto metanólico de la cepa CCM-UdeC 219 no fueron cuantificados en este trabajo, sugerimos que en nuevos estudios se incluya la identificación y cuantificación de estas moléculas.

Por otro lado, el medio de cultivo utilizado en el presente estudio (Potato Dextrose Agar), se prepara a partir de infusión de papa y dextrosa, lo que lo convierte en un medio de base altamente nutritiva que aporta carbohidratos y sales minerales necesarias para el desarrollo de los hongos y actualmente es uno de los más utilizados para el cultivo de hongos fitopatógenos (Valtek, 2018). La preferencia de azúcares como fuente de carbono ha permitido explicar el comportamiento estacional del hongo fitopatógeno *B. cinerea* en cultivos de uvas de mesa y se ha determinado que el aumento de la concentración de carbohidratos favorece significativamente el crecimiento de *B. cinerea* (Vercesi *et al.*, 1997). El extracto acuoso de utilizado para la preparación de EP1 y EP2 contenían cerca del 10% de carbohidratos (10,410

($\pm 1,0$) equivalentes de glucosa %) (Tabla 1). Además, la concentración de fenoles y flavonoides en el extracto acuoso de proteínas fue de 0.054 y 0.052 equivalentes de ácido gálico (%) y equivalentes de quercetina (%) respectivamente (Tabla 1). En este sentido, el reducido contenido de compuestos fenólicos y co-extracción de carbohidratos en el extracto acuoso y, en consecuencia, el enriquecimiento del medio PDA con carbohidratos en los tratamientos EP1 y EP2 pudo propiciar condiciones más favorables para el crecimiento de *B. cinerea*, potenciando su crecimiento en nuestro bioensayo.

Las dicarboximidas como “Captan”, utilizado en este estudio como un fungicida sintético de referencia (Figura 12), actúan interfiriendo con la vía de transducción de señales osmóticas en los hongos y *B. cinerea* presenta diferentes tipos de resistencia a las dicarboximidas; una de las más estudiadas es la mutación tipo 1 del gen putativo de histidina quinasa osmosensora (BcOS1), caracterizada como la sustitución de solo un aminoácido de isoleucina por serina sin afectar la sensibilidad osmótica y patogenicidad de *B. cinerea* (Oshima *et al.*, 2006). En este sentido, la resistencia a los fungicidas es un problema grave que cuestiona la sostenibilidad de la estrategia actual de control de la pudrición gris en diferentes cultivos agrícolas, debido a que, durante los últimos 25 años, *B. cinerea* ha desarrollado un alto índice de resistencia, prácticamente a todos los fungicidas específicos utilizados para su control (Daugaard, 1999; Latorre *et al.*, 2002; Esterio *et al.*, 2007; Latorre & Torres, 2012). Es por esto, que se ha vuelto necesario realizar la rotación y mezcla de productos para mantener la efectividad de los tratamientos. Sin embargo, esta práctica está cada vez más limitada debido a que las imposiciones del mercado internacional son cada vez más exigentes y últimamente han incorporado políticas de desarrollo de la agricultura sustentable, que incluye productos naturales para el control de fitopatógenos (bioestimulantes y biopesticidas), esto debido a que continuamente la Organización Mundial de la Salud ha considerado algunos fungicidas sintéticos ampliamente utilizados como riesgosos para la salud a ciertos niveles de exposición, por vía oral o dérmica (Cardenas *et al.*, 2018). El desarrollo de un producto natural biopesticida requiere de numerosos estudios que incluyen ensayos de eficiencia, seguridad y factibilidad técnica. En este sentido, nuestro estudio demostró que los extractos metanólicos de la cepa CCM-UdeC 219 contienen compuestos biopesticidas antifúngicos que actúan sobre el fitopatógeno *B. cinerea*, lo que representa la primera etapa en el desarrollo de un producto

biopesticida y el primer reporte de actividad fungicida sobre fitopatógenos en extractos de una cianobacteria nativa de la familia Nostocaceae colectada en nuestro país.

6.4. Identificación taxonómica

La cianobacteria CCM-UdeC 219 presenta una morfología típica de la familia Nostocaceae: se desarrolla como un filamento isopolar, con tricomas uniseriados, formadora de heterocistos (e.g. Komárek, 2013).

Las variaciones de largo y ancho de los diferentes tipos celulares, principalmente las células vegetativas de la cepa CCM-UdeC 219 creciendo en diferentes medios de cultivo (Tabla 2), dificultan su identificación taxonómica mediante caracteres citomorfométricos, asimismo, diversos autores han determinado que la morfometría de las células vegetativas en cianobacterias del orden Nostocales es un carácter inestable que no debe ser considerado para la identificación taxonómica a nivel de especies (revisado en Mishra *et al.*, 2015). Por otro lado, la presencia, morfología y disposición de los heterocistos y acinetos pueden ser considerados caracteres de gran valor taxonómico (Rajaniemi *et al.*, 2005). La formación de acinetos apoheterocíticos de la cepa CCM-UdeC 219 (Figura 14) es, en definitiva, un carácter taxonómico de gran valor, ya que este patrón de formación de acinetos es característico de las especies del género *Trichormus*. Además, es de gran utilidad para separar especies de *Anabaena* y *Trichormus* (Komárek, 2013).

En la literatura se ha reportado que frecuentemente cepas de *Trichormus* son identificadas erróneamente dentro del género *Anabaena* y *Nostoc*, debido a la similitud morfológica y genética que conlleva a la confusión de especies de estos géneros en análisis genéticos y morfológicos, lo que sugiere el origen común y estrecha relación entre los géneros *Anabaena*, *Nostoc* y *Trichormus* (Mishra *et al.*, 2015). En nuestro estudio, el análisis de la región ITS del ARNr 16S–23S mostró resultados medianamente resolutivos al ser comparado con las secuencias disponibles en GenBank (NCBI). Una explicación a la ambigüedad de nuestros resultados puede ser la longitud reducida de la secuencia obtenidas desde el producto de PCR.

Los electroferogramas obtenidos de la secuenciación del producto de PCR mostraron zonas de la secuencia con ruido que podrían corresponder a la presencia de más de una versión ITS en la muestra (Figura 17). En la revisión de Boyer y colaboradores (2001) se reveló que la

presencia de múltiples operones de ARNr no idénticos en cianobacterias puede provocar que estudios filogenéticos que incluyan amplificación PCR se pueden ver enfrentados a la amplificación preferencial de algunos operones, lo que puede concluir en ambigüedades en los resultados, en este sentido, la amplificación de múltiples bandas de productos de PCR también puede ser interpretada como la existencia de múltiples operones de ARNr, tal como ocurrió en nuestro análisis cualitativo en gel de agarosa (Figura 15). Este último hallazgo es clave en la interpretación de nuestros resultados y nos permite hipotetizar diferentes situaciones: en primer lugar, la cepa CCM-UdeC 219 posee múltiples operones de ARNr que dificultan su identificación taxonómica mediante herramientas de secuenciación de la región ITS del ARNr 16S–23S. En la misma línea, la secuenciación de las dos bandas de producto PCR por separado puede aportar mayores antecedentes para la identificación taxonómica de la cepa CCM-UdeC 219.

Los análisis taxonómicos mediante herramientas moleculares de especies de la familia Nostocacea (Komárek, 2014) y particularmente en cepas del género *Trichormus* han mostrado dificultades similares en estudios previos. Rajaniemi y colaboradores (2005), determinaron mediante un análisis de similitud de la secuencia del ARNr 16S, que cepas de *Trichormus variabilis*, *Trichormus azollae* y *Trichormus doliolum* separadas de *Anabaena* y *Aphanizomenon* en base al desarrollo de los acinetos, no fueron monofiléticas e incluso sugieren que *Trichormus doliolum* podría estar relacionada con otros géneros distintos a *Nostoc*, *Anabaena* y *Trichormus*. En la actualidad existe un consenso general acerca del origen polifilético del género *Trichormus*; diversos autores mencionan que la taxonomía de algunos morfotipos no está clara y sugieren su revisión mediante análisis genéticos y morfológicos combinados (Rajaniemi *et al.*, 2005; Komárek, 2013; Komárek 2014).

La cepa CCM-UdeC 219 fue colectada el año 2012 en la IV región de Chile en un ambiente de agua dulce (estero) y fue identificada como *Anabaena* sp. en base a su descripción morfológica. Sin embargo, la identidad taxonómica de la cepa fue cuestionada en base a la revisión de las claves dicotómicas de Komárek (2013), por lo que su identificación taxonómica quedó inconclusa. Otras cepas de cianobacterias identificadas preliminarmente como *Anabaena* sp. luego de su aislamiento fueron posteriormente reclasificadas dentro de otros géneros del orden Nostocales. Rehakova y colaboradores (2014) reportaron la identificación errónea de la cepa de *Nodularia* sp. “saline 2” (Figura 18) identificada en primera instancia como *Anabaena* y luego

reclasificada como *Nodularia* en base al análisis del ARNr 16S. Sin embargo, la cepa presenta caracteres morfológicos que no se ajustan al género *Nodularia*, cuya característica más significativa guarda relación con la forma del filamento: células más anchas que largas. *Nodularia* sp. “saline 2” fue caracterizada anteriormente mediante la secuenciación de la región ITS y sobre la base de la secuencia de la cepa CCM-UdeC 219 determinamos que son 97% idénticas, aunque con solo un 62% de cobertura entre las secuencias (ID: KT290379.1). No obstante, la caracterización morfológica presentada en Rehakova y colaboradores (2014) y la formación de acinetos agrupados en largas cadenas, la forma de los heterocistos y filamento en *Nodularia* sp. “saline 2” (Figura 18) presentan un elevado grado de similitud con nuestra cepa (Figura 13 & 14). En el grupo de las nostocaceas, las dimensiones, formas y aparición de acinetos y heterocistos son características morfológicas estables que permiten distinguir diferentes especies (Rajaniemi *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2015). En este sentido, *Nodularia* sp. “saline 2” cultivada en medio BG-11 (Figura 18) es semejante a nuestra cepa en términos de morfometría y apariencia de los acinetos y heterocistos creciendo en medio BG-11 y BG-11 (GT) (Tabla 1 y Figura 13 & 14). Asimismo, la cepa CCM-UdeC 219 y *Nodularia* sp. “saline 2” (Rehakova *et al.*, 2014) son compatibles en términos de morfología del tricoma y acinetos, y relativamente idénticas en cuanto a la morfometría de acinetos y heterocistos con *Trichormus kashiensis* (Figura 19) (Bharadwaja) (Komárek, 2012 como se citó en Komárek 2013) nombrada anteriormente como *Anabaena kashiensis* (Bharadwaja, 1935 como se citó en Komárek, 2013) y *Anabaena variabilis* var. *kashiensis* (Fritsh, 1949 como se citó en Komárek, 2013), reclasificada por desarrollar acinetos apoheterocíticos. En base a estos hallazgos hemos reclasificado de forma preliminar nuestra cepa como *T. kashiensis* y sugerimos que se trata de la misma especie descrita en el trabajo de Rehakova y colaboradores (2014) como *Nodularia* sp. “saline 2”.

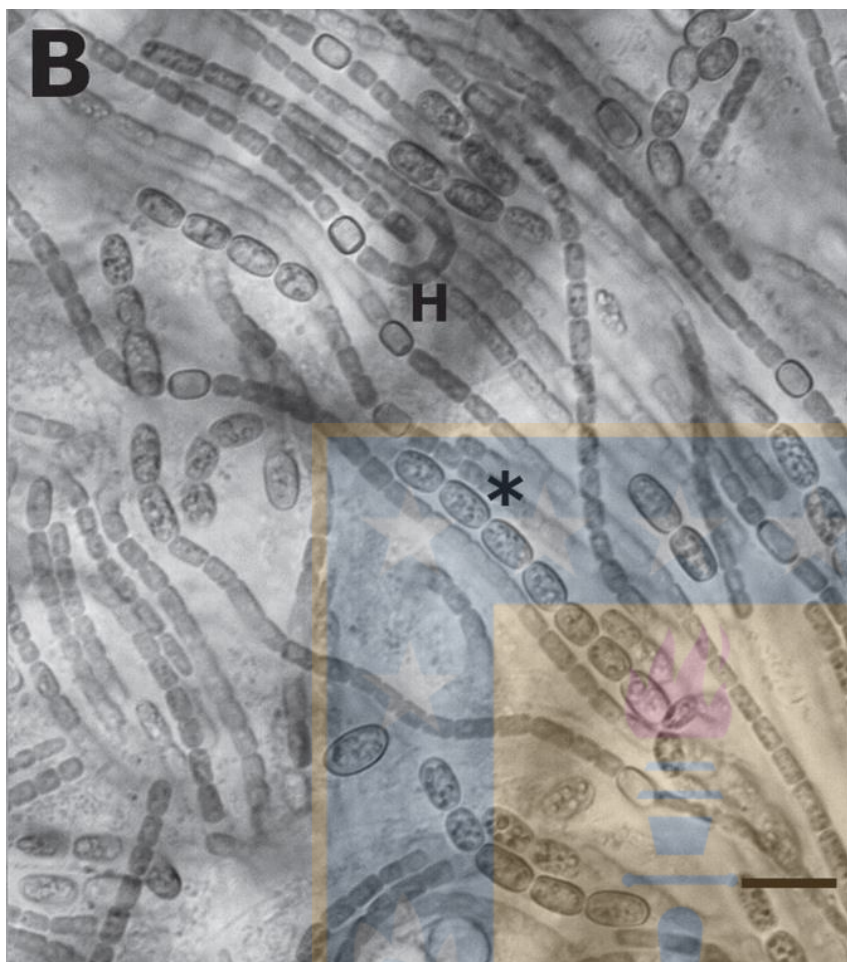


Figura 18. *Nodularia* sp. "Saline 2" (Rehakova *et al.*, 2014).

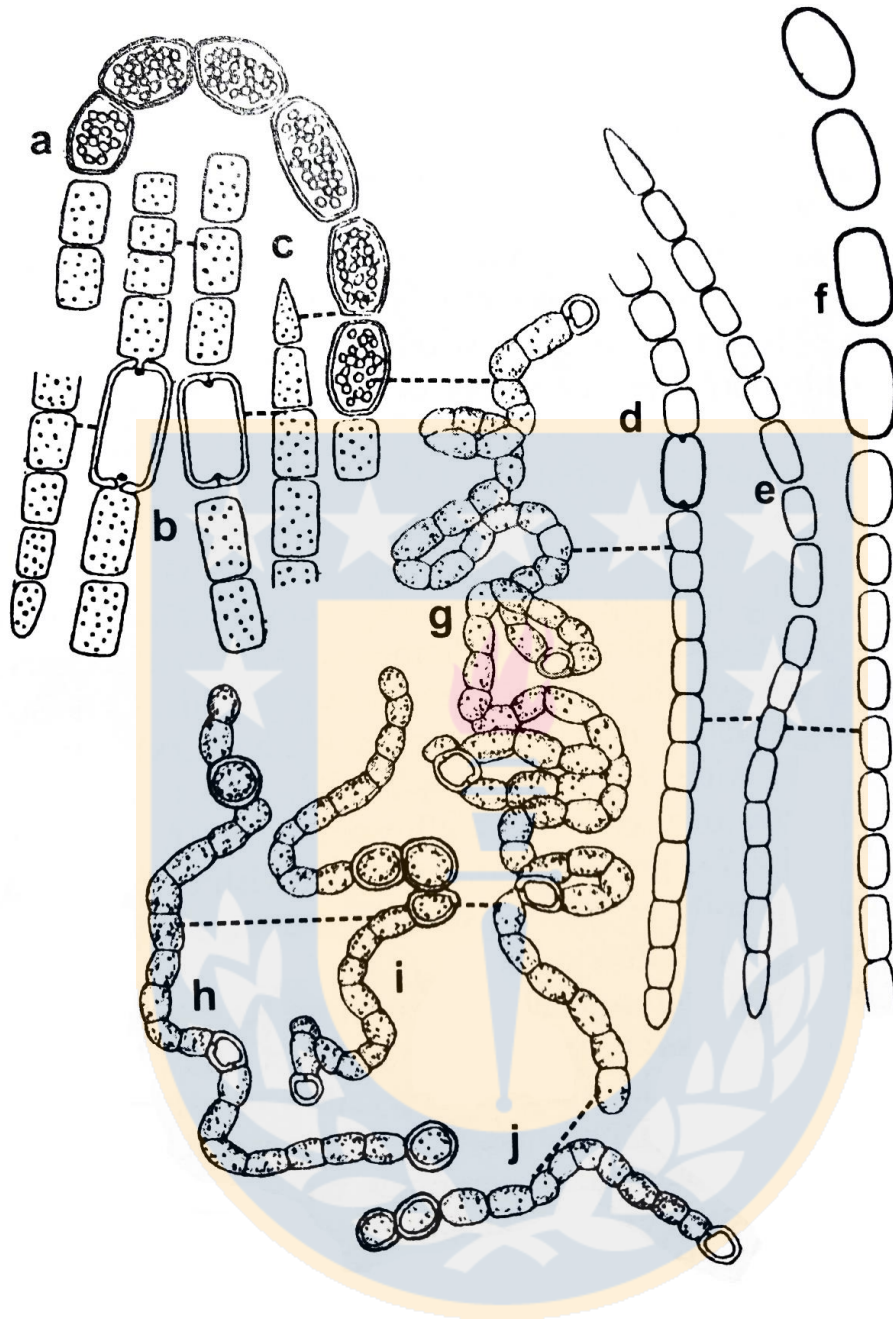


Figura 19. a – c: *T. kashiensis*, d – f: *Anabaena kashiensis* y g – j: *Anabaena variabilis* var. *kashiensis* (Komárek, 2013).

7. CONCLUSIONES

1. La cepa CCM-UdeC 219 se puede escalar a volúmenes de cultivo de 18L en medio de cultivo BG-11. Al ser cultivada en otros medios de cultivo (Spirulina y Watanabe) o en deficiencia de nutrientes (hierro), la cepa CCM-UdeC 219 presenta variaciones citomorfométricas y de desarrollo del tricoma.
2. La composición bioquímica y actividad antioxidante de la biomasa y extracto acuoso provenientes de la cepa CCM-UdeC 219 varía al ser cultivada en diferentes condiciones de disponibilidad de nutrientes, por lo que su escalamiento utilizando medios de cultivo de bajo costo y condiciones semi controladas debe ser optimizado.
3. Los extractos acuosos y de acetona de la cepa CCM-UdeC 219 no son eficaces en la inhibición del crecimiento de *B. cinerea*. El elevado contenido de carbohidratos en los extractos acuosos explicaría el crecimiento mejorado de *B. cinerea*.
4. Los extractos metanólicos de la biomasa de la cepa CCM-UdeC 219 presentan actividad inhibidora del crecimiento sobre el fitopatógeno *B. cinerea* y su actividad puede ser atribuida a la presencia de compuestos fenólicos, lo que requiere estudios adicionales.
5. El análisis morfológico y molecular combinado permitió determinar la identidad taxonómica de la cepa CCM-UdeC 219: se clasificó dentro del género *Trichormus* y de forma preliminar como *Trichormus kashiensis*. Sugerimos la realización de nuevos análisis moleculares utilizando otras regiones del genoma con señal filogenética.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel, S., K. Abo & I. Abdel. 2015. Fungicidal activity of extracellular products of cyanobacteria against *Alternaria porri*. *European Journal of Phycology* 50(2): 239-245.
- Acuña R. 2008. Compendio de fitopatógenos de cultivos agrícolas en Chile. [<https://biblioteca.sag.gob.cl/DataFiles/25-2.pdf>] Revisado: 26 Julio 2021.
- Aguilera, A., M. Amé, D. Andrinolo, L. Bauzá, R. Benítez, E. Titto, R. Echenique, L. Giannuzzi, M. Hansen, M. Kolman, T. Petcheneshsky, L. Rosso, M. Ruiz, G. Salerno, D. Sedan & D. Wunderlin. 2017. Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires. 164 pp.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. 2021. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4: 200-214.
- Alston J.M. & O. Sambucci. 2019. Grapes in the World Economy. Cantu D., & M. Walker. (eds.). *The Grape Genome: Compendium of Plant Genomes*. Springer, Davis, pp. 1-24.
- Araya E., & P. I. Gómez. (manuscrito en preparación). The potential of cyanobacteria as antifungal agents in agriculture: a systematic review of literature.
- Bennett, A., & L. Bogorad. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology*, 58(2): 419–435.
- Berman-Frank, I., Quigg, A., Finkel, Z. V., Irwin, A. J., & Haramaty, L. 2007. Nitrogen-fixation strategies and Fe requirements in cyanobacteria. *Limnology and Oceanography*, 52(5): 2260-2269.
- Bermejo, R., J. Alvarez, F. Acien & E. Molina. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology* 93(1): 73-85.
- Boyer, S. L., Flechtner, V. R., & Johansen, J. R. 2001. Is the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular biology and evolution*, 18(6): 1057-1069.

- Brauer, V. S., C. P. Rezende, A. M. Pessoni, R. G. De Paula, K. S. Rangappa, S. C. Nayaka, V. K. Gupta & F. Almeida. 2019. Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. *Biomolecules*, 9(10): 521.
- Campos, V., S. Lisperguer, J. Weckesser, A. Vera & D. Muñoz. 2005. Cianobacterias y riesgos potenciales de toxicidad en aguas continentales de Chile. *Boletín Micológico*, 20: 73-81.
- Cárdenas, G., L. Vergara & C. Salamanca. 2018. Fungicide properties in Vitro of chitosan ethyl carbamate in the control of vineyards fingies in Chile. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 63(4): 4217-4221.
- Cárdenas, G., Vergara, L., & Salamanca, C. 2018. Fungicide properties in vitro of chitosan ethyl carbamate in the control of vineyards fingies in Chile. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 63(4): 4217-4221.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- Cheng D., He Q. 2020. Iron Deficiency in Cyanobacteria. In: Wang Q. (eds) *Microbial Photosynthesis*. Springer.
- Daugaard, H. 1999. Cultural methods for controlling *Botrytis cinerea* Pers. in strawberry. *Biological Agriculture & Horticulture*, 16(4): 351-361.
- Eguillor, P. 2017. Pérdida y desperdicios de alimentos. [<https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/articulos/perdida-y-desperdicio-de-alimentos-pda-en-chile-avances-y-desafios-diciembre-de-2019>]. Revisado: 26 Julio 2021.
- Eriksen, N. T. 2008. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(1): 1-14.
- Esterio, M., J. Auger, C. Ramos & H. García. 2007. First report of fenhexamid resistant isolates of *Botrytis cinerea* on grapevine in Chile. *Plant Disease*, 91(6): 768-768.
- Gamazo C., Sánchez S., & Camacho A. 2013. *Microbiología basada en la experimentación*. Elsevier.
- Gantt, E. 1981. Phycobilisomes. *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1): 327-347.

- Garlapati, D., M. Chandrasekaran, A. Devanesan, T. Mathimani & A. Pugazhendhi. 2019. Role of cyanobacteria in agricultural and industrial sectors: an outlook on economically important by products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(12): 4709-4721.
- Gómez, P. I. & González M. A. 2001. Genetic polymorphism in eight Chilean strains of the carotenogenic microalga *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta). *Biological Research*, 34(1): 23-30.
- Gómez, P. I., P. Haro, P. Lagos, Y. Palacios, J. Torres, K. Sáez, P. Castro, V. González, I. Inostroza & M. A. González. 2016. Intraspecific variability among Chilean strains of the astaxanthin-producing microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta): an opportunity for its genetic improvement by simple selection. *Journal of Applied Phycology*, 28(4): 2115-2122.
- González, G., M. Moya, C. Sandoval & R. Herrera. 2009. Genetic diversity in Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*): differential response to *Botrytis cinerea* infection. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 7(4): 886-895.
- Guedes, I. A., A. B. F. Pacheco, M. C. P. Vilar, M. M. Mello, M.M. Marinho, M. Lurling & S. M. F. O. Azevedo. 2019. Intraspecific variability in response to phosphorus depleted conditions in the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Raphidiopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 86: 96–105.
- Guikema, J. A., & Sherman, L. A. 1983. Organization and function of chlorophyll in membranes of cyanobacteria during iron starvation. *Plant Physiology*, 73(2): 250-256.
- Guillard, R. 1973. Culture Methods and Growth Measurements In *Handbook of Phycological Methods*. Ed by Stein JR. London:Cambridge University Press. 289-311.
- Gupta, V., Prasanna, R., Cameotra, S., Dureja, P., Singh & R., Sharma, J. 2013. Enhancing the production of an antifungal compound from *Anabaena laxa* through modulation of environmental conditions and its characterization. *Process Biochemistry* 48(5-6): 768-774.

- Haggag, W., Abd, A., & Mohamed, A. 2014. The potential effect of two cyanobacterial species; *Anabaena sphaerica* and *Oscillatoria agardhii* against grain storage fungi. European Scientific Journal, 10(30): 427-443.
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M. A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M. R., & Nafissi-Varcheh, N. (2009). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. Journal of Applied Phycology, 22(1): 43–50.
- Hemlata, S. & Fatma, T. 2018. Extraction, purification and characterization of phycoerythrin from *Michrochaete* and its biological activities. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 13: 84-89.
- Hossain, M. F., Ratnayake, R. R., Meerajini, K., & Wasantha Kumara, K. L. 2016. Antioxidant properties in some selected cyanobacteria isolated from fresh water bodies of Sri Lanka. Food science & nutrition, 4(5): 753-758.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 2016. Moho gris (*Botrytis cinerea*). [<https://www.inia.cl/sanidadvegetal/2016/11/08/moho-gris-Botrytis-cinerea/>] Revisado: 26 Julio 2021.
- Ismaiel, M., El-Ayouty, Y. M., & Piercey-Normore, M. D. 2014. Antioxidants characterization in selected cyanobacteria. Annals of microbiology, 64(3): 1223-1230.
- Ivanov, A. G., Park, Y. I., Miskiewicz, E., Raven, J. A., Huner, N. P. A., & Öquist, G. 2000. Iron stress restricts photosynthetic intersystem electron transport in *Synechococcus* sp. PCC 7942. Febs Letters, 485(2-3): 173-177.
- Kim, J. D. 2006. Screening of Cyanobacteria (Blue-Green algae) from rice paddy soil for antifungal activity against plant pathogenic fungi. Mycobiology, 34(3): 138.
- Komárek, J. 2010. Modern taxonomic revision of planktic Nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. Hydrobiologia, 639(1), 231-243.
- Komárek, J. 2012. Nomenclatural changes in heterocytous cyanoprokaryotes (Cyanobacteria, Cyanophytes). Fottea, 12(1): 141-148.

- Komárek, J. 2013. Cyanoprokaryota: 3. teil / 3rd part: heterocytous genera. Spektrum Akademischer
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., & Johansen, J. R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia, 86(4): 295-335.
- Kunui, K., & Singh, S. S. 2020. Protective role of antioxidative enzymes and antioxidants against iron-induced oxidative stress in the cyanobacterium *Anabaena sphaerica* isolated from iron rich paddy field of Chhattisgarh, India.
- Latorre, B. A. & R. Torres. 2012. Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. Crop Protection 40: 49-52.
- Latorre, B. A., I. Spadaro & M. Rioja. 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. Crop Protection, 21(10): 957-961.
- López-Rodríguez, A., Mayorga, J., Flaig, D., Fuentes, G., Cotabarren, J., Obregón, W. D., & Gómez, P. I. 2021. Comparison of two strains of the edible cyanobacteria *Arthrospira*: Biochemical characterization and antioxidant properties. Food Bioscience, 42: 101144.
- Lowry, O., N. Rosenbrough, A. Farr & R. Randall 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.
- Malviya, D., P. K. Sahu, U. B. Singh, S. Paul, A. Gupta, A. R. Gupta, S. Singh, M. Kumar, D. Paul, J. Rai, H. Singh & G.P. Brahmaprakash. 2020. Lesson from ecotoxicity: Revisiting the microbial lipopeptides for the management of emerging diseases for crop protection. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(4): 1434.
- Michael, A., Kyewalyanga, M. S., Mtolera, M. S., & Lugomela, C. V. 2018. Antioxidants activity of the cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) fusiformis* cultivated in a low-cost medium. African Journal of Food Science, 12(8): 188-195.
- Mishra, S., Bhargava, P., Adhikary, S. P., Pradeep, A., & Rai, L. C. 2015. Weighted morphology: a new approach towards phylogenetic assessment of *Nostocales* (Cyanobacteria). Protoplasma, 252(1): 145-163

- Molina, G., S. Zaldúa, G. González & E. Sanfuentes. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Bosque (Valdivia), 27(2): 126-134.
- Morris, D. L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. Science, 107(2775): 254-255.
- Nuhu, A. A. 2013. Spirulina (*Arthrospira*): An important source of nutritional and medicinal compounds. Journal of Marine biology, 2013.
- Oshima, M., Banno, S., Okada, K., Takeuchi, T., Kimura, M., Ichiishi, A. & Fujimura, M. 2006. Survey of mutations of a histidine kinase gene BcOS1 in dicarboximide-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. Journal of General Plant Pathology, 72(1): 65-73.
- Pagnussatt, F. A., Del Ponte, E. M., Garda, J., & Badiale, E. 2014. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. Pesticide Biochemistry and Physiology, 108: 21-26.
- Pulz, O. & W. Gross. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, 65(6): 635-648.
- Radhakrishnan, B., R. Prasanna, P. Jaiswal, S. Nayak & P. Dureja. 2009. Modulation of biocidal activity of *Calothrix* sp. and *Anabaena* sp. by environmental factors. Biología, 64(5): 881-889.
- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kaštovska, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., & Sivonen, K. 2005. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 55(1): 11-26.
- Rehakova, K., Mareš, J., Lukešová, A., Zapomělová, E., Bernardová, K., & Hrouzek, P. 2014. *Nodularia* (Cyanobacteria, Nostocaceae): A phylogenetically uniform genus with variable phenotypes. Phytotaxa, 172(3): 235-246.
- Renugadevi, K., Nachiyar, C. V., Sowmiya, P., & Sunkar, S. 2018. Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp. TRV57. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 16: 237-242.

- Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Hamid, A. A., & Ghazali, H. M. 2015. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, 33(1): 80–116.
- Sayegh, F. A. Q. & D. J. S. Montagnes. 2011. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresource Technology* 102(3): 3007-3013.
- Scaglioni, P. T., Blandino, M., Scarpino, V., Giordano, D., Testa, G., & Badiale, E. 2018. Application of fungicides and microalgal phenolic extracts for the direct control of Fumonisin contamination in maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(19): 4835-4841.
- Scaglioni, P. T., Oliveira, S., & Badiale, E. 2018. Inhibition of in vitro trichothecenes production by microalgae phenolic extracts. *Food Research International*, 124: 175-180.
- Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Mühling, M., Whitton, B. A. & Wilmotte, A. 1999. *Arthrospira* ('*Spirulina*') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS microbiology letters*, 172(2): 213-222.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7): 671-675.
- Seghiri, R., Kharbach, M., & Essamri, A. 2019. Functional composition, nutritional properties, and biological activities of moroccan *Spirulina* microalga. *Journal of Food Quality*, 2019: 1-11.
- Singh, D. P., R. Prabha, M. S. Yandigeri & D. K. Arora. 2011. Cyanobacteria-mediated phenylpropanoids and phytohormones in rice (*Oryza sativa*) enhance plant growth and stress tolerance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(4): 557-568.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.

- Soto-Sierra, L., Stoykova, P., & Nikolov, Z. L. 2018. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 36: 175–192.
- Souza, M. M., Prietto, L., Ribeiro, A. C., Souza, T. D., & Badiale, E. 2011. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. *Ciencia e Agrotecnologia*, 35(6): 1050-1058.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. C. B. G., & Cohen-Bazire, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological reviews*, 35(2): 171-205.
- Starr, R. C., & Zeikus, J. A. 1993. UTEX-the Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures1. *Journal of Phycology*, 29(s2): 1–106.
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of seawater analysis.
- Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos & D. Hawkins Byrne. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7): 669-675.
- Tiwari, A. & A. Sharma. 2013. Antifungal activity of *Anabaena variabilis* against plant pathogens. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2): 1030-1036.
- Toribio, A. J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., López, M. J., López-González, J. A., & Moreno, J. 2020. Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phytostimulating agents. *Biotechnology Reports*, 26: e00449.
- Valtek 2018. Agar Papa Dextrosa (PDA). URL: <https://www.valtek.cl/wp-content/uploads/2020/02/Agar-Papa-Dextrosa-PDA-Versi%C3%B3n-3-Valtek-1.pdf>
- Vercesi, A., Locci, R., & Prosser, J. I. 1997. Growth kinetics of *Botrytis cinerea* on organic acids and sugars in relation to colonization of grape berries. *Mycological Research*, 101(2): 139-142.
- Verdugo, L., A. Acosta, A. D. Zapata, E. M. Cadena & S. A. Pulido. 2019. Antimicrobial potential of a hydrolyzed protein extract of the microalgae *Nannochloropsis* sp. *DYNA*, 86(211): 192-198.

- Watanabe, A. 1960. List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 6(4): 283-292.
- Wegmann, K. & H., Metzner 1971. Synchronization of *Dunaliella salina* cultures. *Archiv für Mikrobiologie* 78: 360-367.
- Wilmotte, A., & Herdman, M. 2001. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Volume One: The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria, 487-493.
- Xue, Y., P. Zhao, C. Quan, Z. Zhao, W. Gao, J. Li, X. Zu, D. Fu, S. Feng, X. Bai, Y. Zuo & P. Li. 2018. Cyanobacteria-derived peptide antibiotics discovered since 2000. *Peptides*, 107: 17-24.

