UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

CENTRO UNIVERSITARIO DE PLASENCIA

Curso: 2019/2020

Convocatoria: Noviembre

Control biológico en *Quercus ilex*, *Q. suber* y *Castanea sativa* ante *Phytophthora cinnamomi* mediante sílice y *Bacillus amyloliquefaciens*

Trabajo presentado para optar al Título Oficial de

GRADO EN INGENIERÍA FORESTAL Y DEL MEDIO NATURAL

POR LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

POR:

D. RUBÉN GONZÁLEZ GONZÁLEZ

TUTELADO POR:

D. FRANCISCO ALCAIDE ROMERO

Dr. ALEJANDRO SOLLA HACH

PLASENCIA, NOVIEMBRE 2019

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 1
2. OBJETIVOS 5
3. MATERIAL Y MÉTODOS 6
3.1. Evaluación *in vitro* de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 ante *Pc* 6
3.1.1. Evaluación del crecimiento miceliar de *Pc* en medio V_8 con SiO_2 6
3.1.2 Evaluación del crecimiento miceliar de *Pc* en medio PDA conteniendo diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* 8
3.1.3 Evaluación del crecimiento miceliar de *Pc* en medio con SiO_2 en placas de Petri montadas sobre otras placas con *B. amyloliquefaciens* 9
3.1.4. Evaluación del número de lesiones de *Pc* en hoja tras la pulverización individual y combinada de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* 10
3.1.5. Evaluación de la formación de esporangios en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri 12
3.2. Evaluación en planta de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 ante *Pc* 13
3.2.1. Material vegetal 13
3.2.2 Evaluación si SiO_2 + *B. amyloliquefaciens* incrementa el vigor de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* y reduce la mortalidad ante *Pc* 14
4. RESULTADOS 18
4.1. Efecto *in vitro* de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 ante *Pc* 18
4.1.1. Crecimiento miceliar de *Pc* en placa de Petri en medio con SiO_2 18
4.1.2 Crecimiento miceliar de *Pc* en medio conteniendo diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* 21
4.1.3. Crecimiento miceliar de *Pc* en medio con SiO_2 en placas de Petri montadas sobre otras placas con *B. amyloliquefaciens* 22
4.1.4. Número de lesiones de *Pc* en hoja tras la pulverización individual y combinada de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* 25
4.1.5. Formación de esporangios en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri . 27
4.2. Evaluación en planta de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 ante *Pc* 30
4.2.1. Efecto de los tratamientos en la altura de las plantas 30
4.2.2. Efecto de los tratamientos en la tolerancia de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* a *Pc* 35

5. DISCUSIÓN 44
5.1. *Pc* en respuesta a la sílice y *B. amyloliquefaciens* en condiciones *in vitro* 44
5.2. *Pc* en respuesta a la sílice y *B. amyloliquefaciens* en condiciones en planta .. 46
6. CONCLUSIONES 46
7. BIBLIOGRAFÍA 47
ANEJO I: FOTOGRAFÍAS 51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño empleado para la evaluación del crecimiento del micelio de *Pc* en medio con SiO_2. 6

Tabla 2. Diseño empleado para la evaluación del crecimiento del micelio de *Pc* en medio PDA con las cepas ISB05 y ISB06 de *B. amyloliquefaciens*. 8

Tabla 3. Diseño empleado para la evaluación del crecimiento del micelio de *Pc* en medio PDA con SiO_2 en placas de Petri montadas sobre otras placas con *B. amyloliquefaciens*. * = número de placas de Petri utilizadas. 9

Tabla 4. Diseño empleado para evaluar la pudrición ocasionada por *Pc* en hojas de *Q. suber* pulverizadas de forma individual y combinada con SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* y posteriormente sumergidas en una suspensión de zoosporas de *Pc*. * = número de hojas utilizadas. 10

Tabla 5. Diseño de bandejas empleando los diferentes tratamientos repartidos de manera aleatoria para evaluar la pudrición de hojas de *Q. suber* sumergidas en solución de suelo con "plugs" de *Pc*. NB = sin *B. amyloliquefaciens*. 11

Tabla 6. Diseño empleado para la evaluación de la formación de esporangios en "plugs" de *Pc* en placas de Petri. * = número de placas de Petri usadas. 12

Tabla 7. Descripción de las tres especies *Castanea sativa*, *Quercus suber* y *Quercus ilex* evaluadas. 13

Tabla 8. Diseño empleado para evaluar si el SiO_2 + *B. amyloliquefaciens* incrementa el vigor y reduce la mortalidad de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* ante *Pc*. 14

Tabla 9. Reparto detallado de tratamientos utilizados en la evaluación en planta para evaluar el efecto del SiO_2 + *B. amyloliquefaciens* en el incremento del vigor y reducción de la mortalidad de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* ante *Pc*. *= número de bandejas. 15

Tabla 10. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis del crecimiento miceliar de *Pc* en placa de Petri usando diferentes concentraciones de SiO_2. 18

Tabla 11. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis del crecimiento miceliar de *Pc* en placa de Petri usando diferentes concentraciones de SiO_2. 20

Tabla 12. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis del crecimiento miceliar de Pc en placa de Petri usando diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*. 21

Tabla 13. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis del crecimiento miceliar de *Pc* con diferentes concentraciones de SiO_2 en placa de Petri y enfrentado a diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* y diferentes concentraciones de SiO_2. 23

Tabla 14. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis de pudrición de hojas de alcornoque tras la pulverización individual y combinada de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* y posteriormente sumergidas en zoosporas de *Pc*. 25
Tabla 15. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis de la formación de esporangios de "plugs" de *Pc* en placa de Petri usando solución de suelo con diferentes tratamientos..... 28
Tabla 16. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis de la altura de plantas de *Q. suber*, *Q. ilex* y *C. sativa* previamente a la inoculación con los diferentes tratamientos de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens*. 32
Tabla 17. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis de la altura de plantas de *Q. suber*, *Q. ilex* y *C. sativa* previamente a la inoculación con *Pc*. 32
Tabla 18. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis de la altura final de plantas no inoculadas con *Pc* de *Q. suber*, *Q. ilex* y *C. sativa*..... 33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio V_8 usando cuatro tratamientos con distintas concentraciones de SiO_2 (0 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L) en placas de Petri. * = diferencias significativas entre tratamientos (P < 0,05); ns = sin diferencias significativas entre tratamientos. 19

Figura 2. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio V_8 usando cuatro tratamientos con distintas concentraciones de SiO_2 en placas de Petri repicadas; * = diferencias significativas entre tratamientos (P < 0,05); ns = sin diferencias significativas entre tratamientos. 20

Figura 3. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio PDA en placas de Petri, usando tres tratamientos diferentes: tratamiento control (sin *B. amyloliquefaciens*), 0.5 g/L de *B. amyloliquefaciens* ISB05 y 0.5 g/L *B. amyloliquefaciens* ISB06. Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0,001) según el test de Fisher LSD. 22

Figura 4. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio PDA en placas de Petri con diferentes concentraciones de SiO_2 enfrentado a diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* y diferentes concentraciones de SiO_2. Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0,01) según el test de Fisher LSD. 23

Figura 5. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio PDA en placas de Petri teniendo solamente en cuenta el efecto de las cepas de *B. amyloliquefaciens* (ISB05 e ISB06). Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0,001) según el test de Fisher LSD..... 24

Figura 6. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio PDA en placas de Petri teniendo en cuenta solo el efecto de las diferentes concentraciones de SiO_2. * = diferencias significativas entre tratamientos (P < 0,05); ns = sin diferencias significativas entre tratamientos. 24

Figura 7. Porcentaje de pudrición de hojas de *Q. suber* pulverizadas con diferentes concentraciones de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* e introducidas posteriormente en una suspensión de zoosporas de *Pc*. Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0,001) según el test de Fisher LSD. 26

Figura 8. Porcentaje de pudrición de hojas de *Q. suber* teniendo solo en cuenta el efecto de las cepas de *B. amyloliquefaciens* (ISB05 e ISB06). Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,01$) según el test de Fisher LSD. 26
Figura 9. Porcentaje de pudrición de hojas de *Q. suber* teniendo en cuenta solamente el efecto de las diferentes concentraciones de SiO_2. Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$) según el test de Fisher LSD. 27
Figura 10. Número de esporangios observados en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri en los días: 0, 15, 30 y 45, teniendo además en cuenta todos los tratamientos utilizados. * = diferencias significativas entre días evaluados ($P < 0,001$). 28
Figura 11. Número medio de esporangios observados en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri teniendo solamente en cuenta el efecto de los días de análisis del ensayo. Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,01$) según el test de Fisher LSD. 29
Figura 12. Número medio de esporangios observados en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri teniendo solamente en cuenta el efecto de las cepas de *B. amyloliquefaciens* (ISB05 e ISB06). Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,01$) según el test de Fisher LSD. 29
Figura 13. Número medio de esporangios observados en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri teniendo en cuenta solamente el efecto de las diferentes concentraciones de SiO_2. Las barras horizontales son errores estándar y las letras iguales indican no diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,85$) según el test de Fisher LSD. ... 30
Figura 14. Altura final media de las plantas de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* no inoculadas con *Pc* ante los tratamientos cruzados con y sin SiO_2 y con y sin *B. amyloliquefaciens* (ISB05 y ISB06). 34
Figura 15. Altura final de las plantas *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber*, no inoculadas con *Pc*, ante los diferentes tratamientos. 34
Figura 16. Análisis conjunto de las alturas medias de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* no inoculadas con *Pc*. La altura se medió en tres momentos, antes de los tratamientos usando *B. amyloliquefaciens* y SiO_2, antes de la inoculación con Pc del resto de plantas y al final del experimento. 35

Figura 17. Probabilidad de supervivencia de las tres especies (castaño, encina y alcornoque) considerando las que se han muerto exclusivamente por *Pc*. Las letras indican diferencias significativas entre especies ($P < 0.001$). 36
Figura 18. Probabilidad de supervivencia de las tres especies (castaño, encina y alcornoque) considerando las que se han muerto exclusivamente por *Pc* teniendo en cuenta los 6 tratamientos considerados. a) *C. sativa* ($P = 0,454$); b) *Q. ilex* ($P = 0,488$); c) *Q. suber* ($P = 0,873$). 37

Figura I. 1. Placas con medio V_8, *Pc* y diferentes concentraciones de SiO_2. 51
Figura I. 2. Placas con medio V_8, *Pc* repicada y diferentes concentraciones de SiO_2. . 51
Figura I. 3. Preparación del medio PDA. 52
Figura I. 4. Parte delantera de placas con medio PDA, *Pc* y diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*. a) Placa Control (Sin *B. amyloliquefaciens*); b) Placas con *B. amyloliquefaciens* ISB05; c) Placas con *B. amyloliquefaciens* ISB06. 52
Figura I. 5. Parte trasera de placas con medio PDA, *Pc* y diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*. a) Placa Control (Sin *B. amyloliquefaciens*); b) Placas con *B. amyloliquefaciens* ISB05; c) Placas con *B. amyloliquefaciens* ISB06. 53
Figura I. 6. Conjunto de tratamientos para evaluación de volátiles producidos por *B. amyloliquefaciens*. a) Base inferior con *B. amyloliquefaciens* y diferentes concentraciones de SiO_2: b) Base superior con *Pc* y diferentes concentraciones de SiO_2. 54
Figura I. 7. Placas enfrentadas para evaluar volátiles producidos por *B. amyloliquefaciens*. 55
Figura I. 8. Preparación de los tratamientos para pulverización de hojas de alcornoque. 56
Figura I. 9. Pulverización de tratamientos en ramas de alcornoque. 56
Figura I. 10. "Plugs" de *Pc* para suspensión de zoosporas. 57
Figura I. 11. Hojas sumergidas en suspensión de zoosporas. 57
Figura I. 12. Secado y evaluación de hojas afectadas. a) Réplica 1; b) Réplica 2: c) Réplica 3. 58
Figura I. 13. Vasos hidratados con suelo adehesado y diferentes tratamientos de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2. 59
Figura I. 14. Preparación de la solución de suelo. 60
Figura I. 15. Placas con dos "plugs" de *Pc*. 60

Figura I. 16. Placas con solución de suelo y dos “plugs” de *Pc*. 61
Figura I. 17. Medidas del peso, longitud y radícula de las semillas. 62
Figura I. 18. Bandejas preparadas para germinación. 63
Figura I. 19. Anotación de la emergencia. 64
Figura I. 20. Diseño de las plantas antes de los tratamientos. 65
Figura I. 21. Inoculación con *B. amyloliquefaciens* y SiO_2. 65
Figura I. 22. Matraz Erlenmeyer de *Pc*. 66
Figura I. 23. Medición antes de inocular con *Pc*. 66
Figura I. 24. Inoculación de *Pc*. 67
Figura I. 25. Inundación para esporulación de esporangios de *Pc*. 67
Figura I. 26. Todas las bandejas preparadas para la evaluación semanal de la mortalidad. 68
Figura I. 27. Efectos de *Pc*. a) Tallo necrosado; b) Pudrición radicular. 68
Figura I. 28. Plantas sin inocular con *Pc*, observadas el último día del ensayo. 69
Figura I. 29. Plantas inoculadas con *Pc*, observadas el último día del ensayo. 69

RESUMEN

La mortalidad del arbolado inducida por *Phytophthora cinnamomi* (*Pc*) es el principal problema fitosanitario en dehesas y masas de castaño en España. Según evidencias científicas recientes, *Bacillus amyloliquefaciens* protege las plantas ante determinados patógenos, y la sílice (SiO_2) genera un efecto fortificante en los tejidos de las plantas. Dentro del convenio "Estudio del efecto combinado de agentes químicos y biológicos sobre la seca de la dehesa" se evaluó la eficacia combinada de las cepas ISB05 y ISB06 de *B. amyloliquefaciens* (originarias del laboratorio Cobiotex, Le Loroux-Bottereau, Francia) y SiO_2 en condiciones *in vitro* e *in planta* ante *Pc*. La sílice no redujo sustancialmente el crecimiento miceliar en placa de *Pc*, pero sí lo hicieron significativamente las dos cepas de *B. amyloliquefaciens*, especialmente *B. amyloliquefaciens* ISB05, hasta un 63%. Los volátiles emitidos por *B. amyloliquefaciens* redujeron significativamente el crecimiento de *Pc*, en menor grado que el contacto directo. En hojas de *Quercus suber* pulverizadas con *B. amyloliquefaciens* a diferentes concentraciones de SiO_2 y sumergidas posteriormente en una suspensión de zoosporas se observó una menor pudrición que en los controles. El suelo inoculado con *B. amyloliquefaciens* ISB05 tuvo un efecto inhibidor efímero en la formación de esporangios de *Pc*. En este trabajo también se evaluó en invernadero el efecto combinado y separado de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 en el crecimiento y tolerancia a *Pc* de brinzales de *Q. ilex*, *Q. suber* y *C. sativa*. Se observó que el SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* incrementan la altura del castaño y del alcornoque de una savia al final del período vegetativo. Sin embargo, SiO_2 ni *B. amyloliquefaciens* redujeron significativamente la mortalidad de castaños, encinas y alcornoques ante *Pc*.

Palabras clave: Control, alcornoque, castaño, encina, estrés biótico, seca.

Abreviaturas: *Phytophthora cinnamomi* (*Pc*), Sílice (SiO_2).

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La superficie adehesada con arbolado productor de bellotas en el territorio español se estima en 3.515.920 ha, ocupando un 27% de la superficie de bosque. Su área de distribución natural incluye Extremadura (casi 1,3 millones de hectáreas) seguida de Andalucía, Castilla-La Mancha, Castilla - León y Madrid (Pulido y Picardo, 2010). En climas más atlánticos encontraremos superficies adehesadas, pero con otras especies de *Quercus*, como los robles, quejigos o alcornoques, siendo este último unos de los utilizados en nuestro experimento, debido a su gran importancia en ecosistemas susceptibles a incendios y a su susceptibilidad ante *Phytophthora cinnamomi* (en adelante *Pc*).

Tanto la encina (*Quercus ilex*) como el alcornoque (*Quercus suber*) se presentan generalmente en dehesas, en las que se aprovechan sus bellotas para alimentar al ganado y su leña para carbón, además del corcho que proporcionan los alcornoques.

En las dehesas conviven otras especies típicas del monte mediterráneo como jaras, cantuesos, madroños, brezos, durillos, cornicabras, retamas, etc., conservando de este modo el ecosistema que caracteriza a la península ibérica. Además, estos bosques resultan ser el mejor hábitat para la fauna mediterránea, lo que los convierte en ocasiones en cotos de caza e incluso en áreas de reserva naturales, de mayor protección (Ceballos et al., 1971).

Otro de los árboles más representativos de la península ibérica es el castaño (*Castanea sativa*), cuya superficie puede variar si bien contabilizamos solo la superficie forestal (aproximadamente 275.000 ha según el Inventario Forestal Nacional) o la superficie agrícola dedicada a producción de castaña (111.000 ha, según la Red Estatal del Castaño) (Montero, 2018). Es considerada una especie de alto valor económico, cultivada tanto por la producción de fruto como por la de madera (Vettraino et al., 2005). Está presente en todos los países de la cuenca del mar Mediterráneo desempeñando un papel importante en la economía rural (Corredoira et al., 2012).

Estas especies se encuentran dentro de los denominados sistemas agroforestales, en los que se observan severas alteraciones y amenazas generadas principalmente por el cambio climático y la introducción de microorganismos patógenos.

Con el cambio climático se prevé un aumento de la temperatura (Stocker et al., 2013) que favorecerá la incidencia de importantes enfermedades en el ámbito forestal (Sturrock et al., 2011; Pautasso et al., 2012; Helfer, 2013; Martín-García et al., 2014). También se espera una mayor irregularidad de las precipitaciones, con episodios acusados de estrés hídrico y condiciones prolongadas de encharcamiento (Bailey-Serres y Colmer, 2014) que potenciarán las interacciones entre patógeno-huésped (Yáñez-López et al.,2012; Corcobado et al., 2014). El comercio global ha supuesto la aparición de múltiples enfermedades, dentro de los cuales destaca el género *Phytophthora* por su elevado impacto en casi todas las masas forestales (Santini et al., 2013; Jung et al., 2016).

Se han contemplado muchos factores como agentes causales del decaimiento y muerte de las masas forestales españolas, pero entre todos destaca la pudrición radicular ("La seca" en *Quercus*, "La tinta" en *Castanea*) causada por el patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands (Balci y Halmschlager, 2003). Este oomiceto de origen asiático fue detectado por primera vez en Japón, y se observaron los primeros indicios en España y Portugal hacia el Siglo XIX (Vannini y Vettraino, 2001; Vettraino et al., 2005; Corredoira et al., 2012). Se propaga por el suelo siendo el responsable del decaimiento y la mortalidad del arbolado en dehesas y masas de castaño (Horta et al., 2010; Ruiz et al., 2012). Según las condiciones ambientales puede ser un proceso lento o darse súbitamente (en pocos meses). La sintomatología suele apreciarse a nivel aéreo con una leve amarillez y/o marchitamiento foliar, llegando a la defoliación y muerte regresiva de brotes y ramas (puntisecado). A nivel radicular la enfermedad aparece antes, causando necrosis de la raíz, difícilmente detectable sin utilizar los medios adecuados (Serrano, 2012).

Generalmente, respondemos a las infecciones radiculares en varias líneas de defensa. El control biológico es una de ellas, optando por el uso de organismos que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar los efectos dañinos en las plantas o sus productos (Serrano y Galindo, 2007).

La influencia de las propiedades del suelo sobre el ciclo vital de *Pc* ha sido estudiada en condiciones de laboratorio, dejando escasos trabajos en condiciones

naturales, destacando los trabajos de los autores Gómez-Aparicio et al. (2012), Shearer y Crane (2011) y Corcobado-Sánchez (2013).

En el suelo existen una gran diversidad de microorganismos de supresión u control sobre *Pc*. Algunas bacterias terrestres son capaces de inhibir eficientemente el crecimiento de hongos patógenos (Zhao et al., 2012; Ahmed et al., 2014; Siahmoshteh et al., 2016), reduciendo de manera directa la producción de esporangios (Broadbent y Baker, 1974; Downer et al., 2001).

Muchas cepas bacterianas, especialmente del género *Bacillus*, tienen baja toxicidad, alta biodegradabilidad y características respetuosas con el medio ambiente, convirtiéndose en candidatas para la formulación de biopesticidas (Vitullo et al., 2012). Comparadas con pesticidas químicos, algunas son incluso clasificadas como probióticas (Zhao et al., 2012; Ahmed et al., 2014). Este es el caso de *Bacillus amyloliquefaciens*, una bacteria grampositiva aeróbica o bajo ciertas condiciones anaeróbicas que se encuentran ampliamente en el suelo y el agua, considerándose un reconocido agente de control biológico que produce compuestos activos (enzimas extracelulares) que causan la rotura de las paredes celulares de hongos como *Pc* (Nagórska et al., 2007; Chakraborty et al., 2006). Además del potencial antagónico de estas bacterias contra hongos patógenos, el género *Bacillus* facilita la solubilización de agentes químicos del suelo, poniéndolos a disposición de las plantas y mejorando su crecimiento (Kumar et at., 2012).

Por su parte el silicio (Si), aunque no es un elemento considerado esencial, es un importante constituyente energético de las plantas (Epstein, 1999). En este sentido, varios estudios demuestran que la aportación de silicio proporcionaba un aumento de la resistencia contra infecciones fúngicas en plantas herbáceas (Bathoova et al., 2018; Araújo et al., 2019), incluidas las infecciones producidas por *Pc* (Datnoff et al., 2001). El silicio estimula mecanismos de defensa que ayudan a combatir al patógeno, y mantiene un contenido de agua en la hoja, regulando su pérdida (Tubaña y Heckman, 2015).

Los estudios sobre el efecto de la sílice (SiO_2) y *B. amyloliquefaciens* en Fagáceas (castaño, encina, alcornoque, etc.) son prácticamente inexistentes. Carneiro-Carvalho et al. (2017) halló que las plantas de castaño tratadas con SiO_2 tuvieron una mayor tasa de supervivencia como resultado de la presencia de fitolitos

(biomineralización de origen vegetal) en los tejidos radiculares, que actuaron como una barrera mecánica reduciendo el desarrollo de estructuras patógenas.

En general se podría decir que la aplicación de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* ofrece un nuevo tema de investigación por su potencial para reducir el impacto de *Pc* y ser un producto más respetuoso con el medio ambiente en comparación con otros tratamientos químicos. Este trabajo surgió como una colaboración o convenio financiado por la empresa Nutrición y Gestión S.L., que acudió al grupo INDEHESA para evaluar el impacto *in vitro* e *in planta* de SiO_2 y diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* (ISB05 y ISB06) ante *Pc*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Se pretende implementar protocolos específicos de acción en campo que ofrezcan esperanza sobre la recuperación del ecosistema adehesado de forma sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

El objetivo general de este trabajo de investigación dentro del convenio "Estudio del efecto combinado de agentes químicos y biológicos sobre la seca de la dehesa" es evaluar la eficacia de *B. amyloliquefaciens* como agente de control biológico conjuntamente con la aplicación de SiO_2, con la intención de fijar las dosis mínimas capaces de reducir significativamente los síntomas causados por *Pc*. Para ello se abordan los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el efecto combinado de las cepas de *B. amyloliquefaciens* (ISB05 y ISB06) y la sílice activa (SiO_2) en la densidad e infectividad del inóculo de *Pc* en condiciones *in vitro*.

- Evaluar sobre el patosistema patógeno/huésped el efecto combinado y separado de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 en el crecimiento y tolerancia a *Pc* de brinzales de *Q. ilex*, *Q. suber* y *C. sativa* en invernadero en condiciones controladas.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado describiremos el material y los métodos empleados para la elaboración del estudio y consecución de los objetivos propuestos.

3.1. Evaluación in vitro de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 ante *Pc*

Con el objetivo de estudiar el efecto de distintas cepas de *B. amyloliquefaciens* y sílice (SiO_2) en la densidad e infectividad del inóculo de *Pc* en condiciones *in vitro*, la empresa Nugest (Nutrición y Gestión S.L., Badajoz, España) nos proporcionó las cepas ISB05 y ISB06 de *B. amyloliquefaciens* (originarias del laboratorio Cobiotex, Le Loroux-Bottereau, Francia) y la sílice (cuarzo molido Dorsilit® 16.900). La cepa de *Pc* (*Pc* -1080) usada en el experimento procedía del aislamiento de raíces de árboles adehesados de *Q. ilex* en declive obtenida en Valverde de Mérida (Badajoz). *Pc* se conservó a 4ºC en nevera y fue periódicamente repicada, inoculada y reaislada a partir de medio PDA y V_8-agar para mantener su virulencia a lo largo del tiempo.

A partir de este material se llevó a cabo el estudio *in vitro* y para ello se diseñaron cinco ensayos diferentes que se detallarán en cada punto.

3.1.1. Evaluación del crecimiento miceliar de *Pc* en medio V_8 con SiO_2

Para evaluar el crecimiento miceliar de *Pc* en medio V_8 con SiO_2 en placas de Petri utilizamos el siguiente diseño:

Tabla 1. Diseño empleado para la evaluación del crecimiento del micelio de *Pc* en medio con SiO_2.

Tratamiento	0,0 g/L SiO_2 (Control)	0,5 g/L SiO_2	1,0 g/L SiO_2	2,0 g/L SiO_2
Nº placas de Petri	3	3	3	3

En total, se prepararon 12 placas de Petri (tres placas por tratamiento) con medio V_8-agar conteniendo sílice (SiO_2) en las dosis arriba indicadas (Tabla 1). Las diferentes concentraciones de SiO_2 por tratamiento (Tabla 1) se estimaron a partir de la dosis en campo establecida (300 g de SiO_2 en 300 L por ha).

El medio de cultivo usado, V_8-agar, se elaboró a partir de un zumo constituido por ocho vegetales (tomate, zanahoria, apio, remolacha, perejil, lechuga, berro y espinaca) y un agente gelificante “agar” utilizado para dar solidez. El medio V_8-agar se

preparó conforme a la siguiente concentración en g/L: 15 g/L de agar-agar (Scharlau), 1.5 g/L de $CaCO_3$ (Panreac), 100 ml de V_8 y 900 ml de H_2O destilada dentro de un matraz Erlenmeyer de 1L. Posteriormente, a cada matraz se le añadió la dosis de SiO_2 establecida por tratamiento (Tabla 1), se mezcló con el medio durante 10 minutos en un agitador magnético ("Velp Scientifica" ARE, Italia) y se llevó a ebullición en una autoclave eléctrica (Mediclave 12, Grecia) durante 20 minutos a una temperatura de 121ºC para una óptima esterilización. Finalmente, los matraces se agitaron de nuevo y se dejaron reposar unos minutos a temperatura ambiente dentro de una cámara de flujo laminar horizontal (Mini- H, España) para mantener un ambiente aséptico. Una vez enfriados, se vertió el medio en placas de Petri cubriendo aproximadamente 5 mm de espesor. Fue necesario homogenizar el medio constantemente en el transcurso de esta última operación para evitar que el agar y el SiO_2 sedimentasen en el fondo del matraz y asegurando que se distribuyesen por igual en todas las placas. Se dibujaron dos líneas en cruz en la base externa de cada placa para la evaluación del crecimiento miceliar de *Pc*.

A continuación, dentro de la cámara de flujo laminar horizontal se sembraron en el centro de cada placa de Petri “plugs” de micelio con forma circular de 0.5 cm de diámetro procedentes del borde de una colonia de *Pc* crecida previamente entre 3-5 días a 22ºC con el fin de incrementar la actividad del oomiceto. Las tres placas por tratamiento se cerraron herméticamente y se incubaron a 22ºC en una cámara frigorífica (VELP, Refrigerated Thermostats FOC 225E, Italia) (Figura I. 1). El crecimiento miceliar se midió cada día a la misma hora y cuando el control (0,0 g/L SiO_2) alcanzó el borde de la placa se procedió a repicar el material en 12 nuevas placas de Petri (Figura I. 2) y se midió de nuevo el crecimiento de la misma manera con el fin de observar finalmente el efecto fungistático-fungitóxico del SiO_2.

3.1.2 Evaluación del crecimiento miceliar de *Pc* en medio PDA conteniendo diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*

Para evaluar el crecimiento miceliar de *Pc* en medio PDA usando dos cepas diferentes de *B. amyloliquefaciens* en placas de Petri se utilizó el siguiente diseño:

Tabla 2. Diseño empleado para la evaluación del crecimiento del micelio de *Pc* en medio PDA con las cepas ISB05 y ISB06 de *B. amyloliquefaciens*.

Tratamiento	N.º placas Petri sin *Pc*	N.º placas Petri con *Pc*
Sin *B. amyloliquefaciens* (Control)	-	3
0.5 g/L *B. amyloliquefaciens* ISB05	3	3
0.5 g/L *B. amyloliquefaciens* ISB06	3	3

En total, se prepararon 15 placas de Petri con medio PDA (Potato Dextrose Agar) repartidas según se muestran en la Tabla 2. El medio PDA se elaboró suspendiendo 39 g/L del polvo liofilizado (conteniendo 4 g/L de peptona de patata, 20 g/L de glucosa y 15 g/L de agar-agar) (Scharlau) en agua destilada dentro de un matraz Erlenmeyer de 1L (Figura I. 3). A continuación, la solución resultante se mezcló durante 10 minutos usando un agitador magnético y se llevó a ebullición en una autoclave eléctrica, hasta alcanzar una temperatura de 121ºC durante 20 minutos para una óptima esterilización. Posteriormente, los matraces conteniendo el medio PDA se dejaron reposar y enfriar a temperatura ambiente hasta que alcanzaron unos 40-45ºC aproximadamente, momento óptimo en el que se agregaron las cepas ISB05 y ISB06 de *B. amyloliquefaciens* a una concentración de 0.5 g/L, respectivamente, en función del tratamiento (Tabla 2). Se usó de nuevo un agitador magnético durante 5 minutos con el fin de obtener una solución homogénea. Finalmente, cada matraz se vació en placas de Petri cubriéndolas aproximadamente 5 mm de espesor. Fue necesario homogenizar el medio constantemente en el transcurso de esta última operación para evitar que el agar y *B. amyloliquefaciens* sedimentasen en el fondo del matraz y asegurando que se distribuyesen por igual en todas las placas. Se dibujaron dos líneas en cruz en la base externa de la placa para la evaluación del crecimiento miceliar de *Pc*. Todo ello se realizó dentro de una cámara de flujo laminar horizontal para mantener un ambiente aséptico.

Para los tratamientos sin *Pc* (Tabla 2) se observó la forma de crecimiento de las cepas ISB05 y ISB06 de *B. amyloliquefaciens* en placa de Petri. Para los tratamientos

con *Pc* (Tabla 2), dentro de la cámara de flujo laminar horizontal se sembraron "plugs" de micelio con forma circular de 0.5 cm de diámetro procedentes del borde de una colonia de *Pc* crecida previamente entre 3-5 días a 22ºC con el fin de incrementar la actividad del oomiceto. Las tres placas por tratamiento (Figura I. 4 y Figura I. 5) se cerraron herméticamente y se incubaron a 22ºC en una cámara frigorífica. El crecimiento miceliar se midió cada día a la misma hora durante 10 días con el fin de observar adecuadamente el efecto fungistático de las dos cepas de *B. amyloliquefaciens*.

3.1.3 Evaluación del crecimiento miceliar de *Pc* en medio con SiO_2 en placas de Petri montadas sobre otras placas con *B. amyloliquefaciens*

Para evaluar el crecimiento miceliar de *Pc* en medio PDA con SiO_2 en placas de Petri montadas sobre otras placas con *B. amyloliquefaciens* se utilizó el siguiente diseño:

Tabla 3. Diseño empleado para la evaluación del crecimiento del micelio de *Pc* en medio PDA con SiO_2 en placas de Petri montadas sobre otras placas con *B. amyloliquefaciens*. * = número de placas de Petri utilizadas.

		Tratamiento			
		0,0 g/L SiO_2 (Control)	0,5 g/L SiO_2	1,0 g/L SiO_2	2,0 g/L SiO_2
Base superior	Medio con "plug" de *Pc*	9*	9	9	9
Base inferior	Medio sin *B. amyloliquefaciens* (Control)	3	3	3	3
	Medio con 0.5 g/L *B. amyloliquefaciens* ISB05	3	3	3	3
	Medio con 0.5 g/L *B. amyloliquefaciens* ISB06	3	3	3	3

En este ensayo se prepararon un total de 72 placas con medio PDA repartidas de la siguiente manera (Tabla 3 y Figura I. 6): usadas como base superior fueron 36 placas conteniendo un "plug" de *Pc*; usadas como base inferior fueron 12 placas sin *B. amyloliquefaciens* (control), 12 placas conteniendo la cepa ISB05 y 12 placas con la cepa ISB06, respectivamente; y, además, cada una de ellas incluía su respectiva dosis de sílice (SiO_2) tal y como se indicada en la Tabla 3. La elaboración del medio de cultivo PDA se realizó siguiendo los mismos pasos que en el apartado anterior (3.1.2.).

Para llevar a cabo el ensayo, en primer lugar, sembramos las diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* en placas de Petri con medio PDA y diferentes concentraciones de SiO_2 que se incubaron en una cámara frigorífica a 22ºC durante cinco días. Por otro lado, en el centro de otras placas de Petri con medio PDA y diferentes concentraciones de SiO_2, se sembraron "plugs" de 0,5 cm de diámetro de *Pc* crecida previamente durante cinco días. Se dibujaron dos líneas en cruz en la base externa de dichas placas para la evaluación del crecimiento miceliar de *Pc*. Todo ello se realizó dentro de una cámara de flujo laminar horizontal para mantener un ambiente aséptico.

Al finalizar con este proceso se enfrentaron las placas conteniendo los "plugs" de *Pc* (base superior) con las placas con de las diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* (base inferior) y distintas concentraciones de SiO_2 en ambos casos (Figura I. 7). Ambas bases se sellaron herméticamente con parafina para evaluar el efecto de los volátiles producidos por las diferentes cepas (ISB05 y ISB06) en presencia de diferentes concentraciones de SiO_2. Se incubó en una cámara frigorífica a 22ºC y se hizo un seguimiento del crecimiento cada día y a la misma hora durante 10 días para evaluar el efecto fungistático-fungitóxico de los volátiles producidos por las cepas ISB05 y ISB06 de *B. amyloliquefaciens* a diferentes concentraciones de SiO_2 ante *Pc*.

3.1.4. Evaluación del número de lesiones de *Pc* en hoja tras la pulverización individual y combinada de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens*

Para evaluar el porcentaje de pudrición causado por *Pc* en hojas de *Q. suber* tras la pulverización individual y combinada de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens*, se utilizó el siguiente diseño (Tabla 4) que fue replicado tres veces (Tabla 5).

Tabla 4. Diseño empleado para evaluar la pudrición ocasionada por *Pc* en hojas de *Q. suber* pulverizadas de forma individual y combinada con SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* y posteriormente sumergidas en una suspensión de zoosporas de *Pc*. * = número de hojas utilizadas.

Tratamiento	0,0 g/L SiO_2 (Control)	0,5 g/L SiO_2	1,0 g/L SiO_2	2,0 g/L SiO_2
Sin *B. amyloliquefaciens* (Control)	7*	7	7	7
0,5 g/L *B. amyloliquefaciens* ISB05	7	7	7	7
0,5 g/L *B. amyloliquefaciens* ISB06	7	7	7	7

Se trata de pulverizar las hojas de alcornoque con las cuatro concentraciones de SiO_2, con y sin las diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*. Cada solución se preparó conforme a la siguiente concentración en g/L (Tabla 4) en 0,33 L de H_2O destilada dentro de pulverizadores manuales (Figura I. 8) que fueron trasladados al campo donde se eligieron 12 ramas separadas de un alcornoque vigoroso y se pulverizaron los diferentes tratamientos (Figura I. 9). Transcurridos siete días, se volvió a pulverizar del mismo modo y tras otros siete días se recogieron las muestras y se llevaron al laboratorio. Una vez allí se prepararon 3 bandejas dividas en 12 porciones (Tabla 5) con los tratamientos repartidos de manera aleatoria en cada bandeja, en las cuales se introdujo H_2O y un "plug" de *Pc* de 0,5 cm de diámetro por tratamiento (Figura I. 10 y Figura I. 11), para ver el efecto que causaban las zoosporas al ponerlas en contacto con las hojas tratadas.

Tabla 5. Diseño de bandejas empleando los diferentes tratamientos repartidos de manera aleatoria para evaluar la pudrición de hojas de *Q. suber* sumergidas en solución de suelo con "plugs" de *Pc*. NB = sin *B. amyloliquefaciens*.

Bandeja 1		**Bandeja 2**		**Bandeja 3**	
0 g/L SiO_2-NB*	2 g/L SiO_2-ISB06	0.5 g/L SiO_2-ISB05	1 g/L SiO_2-NB	1 g/L SiO_2-ISB06	0.5 g/L SiO_2-NB
1 g/L SiO_2-NB	0.5 g/L SiO_2-NB	0 g/L SiO_2-NB	0.5 g/L SiO_2-NB	2 g/L SiO_2-ISB06	0 g/L SiO_2-ISB06
2 g/L SiO_2-NB	1 g/L SiO_2-ISB06	1 g/L SiO_2-ISB06	2 g/L SiO_2-ISB05	0.5 g/L SiO_2-ISB05	1 g/L SiO_2-ISB05
0.5 g/L SiO_2-ISB05	0 g/L SiO_2-ISB05	2 g/L SiO_2-ISB06	0.5 g/L SiO_2-ISB06	0.5 g/L SiO_2-ISB06	2 g/L SiO_2-ISB05
0 g//L SiO_2-ISB06	1 g//L SiO_2-ISB05	0 g/L SiO_2-ISB06	0 g/L SiO_2-ISB05	0 g/L SiO_2-ISB05	2 g/L SiO_2-NB
0.5 g/L SiO_2-ISB06	2 g/L SiO_2-ISB05	1 g/L SiO_2-ISB05	2 g/L SiO_2-NB	0 g/L SiO_2-NB	1 g/L SiO_2-NB

Dejamos el ensayo otros siete días hasta que finalmente se evaluó el número de lesiones y se analizó el área foliar afectada (Figura I. 12).

3.1.5. Evaluación de la formación de esporangios en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri

Para evaluar la formación de esporangios en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri en una solución de suelo que previamente fue inoculado, se tuvieron en cuenta los tratamientos que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Diseño empleado para la evaluación de la formación de esporangios en "plugs" de *Pc* en placas de Petri. * = número de placas de Petri usadas.

Tratamiento	0,0 g/L SiO_2 (Control)	0,5 g/L SiO_2	1,0 g/L SiO_2	2,0 g/L SiO_2
Sin *B. amyloliquefaciens* (Control)	1*	1	1	1
2 g/L de *B. amyloliquefaciens* ISB05	1	1	1	1
2 g/L de *B. amyloliquefaciens* ISB06	1	1	1	1

En primer lugar, tapizamos suelo de dehesa para conseguir una estructura más homogénea, depositándose en 12 vasos de tubo de plástico de 0,33 L que posteriormente fueron inoculados con los tratamientos que se muestran en la Tabla 6 y Figura I. 13. Tras la inoculación, para cada tratamiento se elaboró solución de suelo introduciendo en un vaso de precipitado 10 g de suelo procedente de los vasos de tubo previamente inoculados en 100 ml de agua destilada, removiéndose con un agitador magnético durante 10 min (Figura I. 14). Una vez mezclada la solución, se extrajo con pipeta 10 ml de la parte superior del vaso de precipitado, evitando las partículas flotantes, y se vertió sobre otro vaso similar. Por último, se diluyeron esos 10 ml en 90 ml de agua destilada consiguiendo de este modo los 100 ml de solución de suelo para cada tratamiento.

Por otro lado, se prepararon placas de Petri que fueron repartidas de la siguiente manera: 1 placa por tratamiento (12 en total) (Tabla 6) y cada una con dos "plugs" redondos de 0,5 cm de diámetro pertenecientes a una colonia de *Pc* que creció durante 3-5 días en V_8-agar. Los dos "plugs" se colocaron en el centro de cada placa de Petri equidistantes entre sí y el borde (Figura I. 15).

A continuación, cada placa se inundó con agua destilada e incubó a 22ºC en una cámara frigorífica durante dos horas. Trascurrido el tiempo, el agua fue reemplazada para retirar los azúcares disueltos usando una jeringuilla y cada placa se volvió de nuevo

a cubrir con agua destilada otras dos horas. Finalmente, tras elaborar la solución de suelo, el agua destilada volvió a ser retirada y esta vez se vertió en su lugar la solución de suelo (Figura I. 16).

El ensayo se evaluó transcurridas 24 horas y se contabilizó el número de esporangios formados usando una lupa de aumento 10x en un microscopio electrónico (Olimpus cx41). Se hicieron tres medidas por cada "plug". El ensayo se hizo para el día justo de la inoculación del suelo, día 0, y se repitió exactamente igual los días 15, 30 y 45 respectivamente.

3.2. Evaluación en planta de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 ante *Pc*

3.2.1. Material vegetal

Para la evaluación en planta de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 ante *Pc*, se realizó un experimento en invernadero con plántulas de un año de edad. El invernadero estaba situado en el Centro Universitario de Plasencia (40º 02' N; 6º 05' W; 374 msnm, oeste de España). En noviembre de 2018, se muestrearon en Extremadura dos árboles madre por población de tres especies de Fagáceas diferentes (*C. sativa*, *Q. suber* y *Q. ilex*) (Tabla 7). Se recogieron a mano 250 semillas por árbol y se almacenaron en cámara fría a 4ºC durante dos semanas. Transcurrido este tiempo, se sumergieron las semillas en agua descartando las flotantes como inviables. Las semillas restantes fueron sumergidas en una solución fungida (2 g L^{-1} Thiram 80GD, ADAMA Inc., España) durante 10 minutos y enjuagadas antes de la siembra.

Tabla 7. Descripción de las tres especies *Castanea sativa*, *Quercus suber* y *Quercus ilex* evaluadas.

Población	Localización	Coordenadas (HUSO 30)	Altitud (msnm)	T (ºC)	P. Anual (mm)
C. sativa	Valle de matamoros, Badajoz	38º 22' 29.5" N 6º 48' 0.55" W	618	14.8	653
Q. suber	Jerez de los caballeros, Badajoz	38º 20' 38.5" N 6º 47' 0.031" W	481	15.5	603
Q. ilex	Villasbuenas de Gata, Cáceres	40º 8' 25.3" N 6º 36' 46.5" W	603	15.5	56.7

T, temperatura; P., precipitación. Fuente: www.climate-data.org.

3.2.2 Evaluación si SiO_2 + *B. amyloliquefaciens* incrementa el vigor de *C. sativa, Q. ilex y Q. suber* y reduce la mortalidad ante *Pc*

Para evaluar si el SiO_2 + *B. amyloliquefaciens* incrementa el vigor de *C. sativa, Q. ilex y Q. suber* y reduce la mortalidad ante *Pc* se tuvieron en cuenta los tratamientos que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Diseño empleado para evaluar si el SiO_2 + *B. amyloliquefaciens* incrementa el vigor y reduce la mortalidad de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* ante *Pc*.

Tratamiento	Pc no (x2)		Pc sí (x2)	
	Bacillus no	*Bacillus* sí	*Bacillus* no	*Bacillus* sí
SiO_2 no	48 plantas (control)	48 plantas	96 plantas	96 plantas
SiO_2 sí	48 plantas	48 plantas	96 plantas	96 plantas

En diciembre de 2018, las semillas de castaño, encina y alcornoque se pesaron, se midieron (longitud de la semilla y de la radícula de aquellas ya germinadas) (Figura I. 17) y se pusieron a germinar en bandejas de 48 alveolos (300 ml de volumen; 18 cm de alto, 5,3 × 5,3 cm de superficie superior) que contenían suelo de dehesa no tratado y turba (1:2, pH 5,5, sólo en los alveolos con semillas de castaño). Una vez sembradas, se recubrieron con una fina capa de arena para mantener la humedad del sustrato y favorecer la germinación (Figura I. 18). Se realizó una evaluación semanal de la emergencia de las plántulas durante 3 meses (Figura I. 19).

Las plantas se dispusieron según un diseño de bloques al azar (Figura I. 20), con la 'especie' (tres categorías: *C. sativa*, *Q. suber* y *Q. ilex*) actuando como factor principal. Las tres especies estaban representadas en cada bandeja por 48 individuos de los dos árboles madre seleccionados. El experimento comprendió en definitiva un total de 24 bandejas con 1152 semillas que incluyó 384 plantas por especie y 192 plantas por árbol madre.

De forma más detallada las 24 bandejas empleadas siguieron el siguiente reparto de tratamientos:

Tabla 9. Reparto detallado de tratamientos utilizados en la evaluación en planta para evaluar el efecto del SiO_2 + *B. amyloliquefaciens* en el incremento del vigor y reducción de la mortalidad de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* ante *Pc*. *= número de bandejas.

Tratamiento	*Pc* no			*Pc* sí		
	Bacillus no	*Bacillus* ISB05	*Bacillus* ISB06	*Bacillus* no	*Bacillus* ISB05	*Bacillus* ISB06
SiO_2 no	2*	1	1	4	2	2
SiO_2 si	2	1	1	4	2	2

En abril de 2019, a los 4 meses aproximados desde la siembra y antes de la inoculación con las cepas de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2, se midió la altura de las plantas. Para la preparación de la solución de SiO_2 y las cepas de *B. amyloliquefaciens* se utilizaron concentraciones de 2g/L de producto que se diluyó en agua destilada. Se inoculó 1 ml de la solución de *B. amyloliquefaciens* y 1 ml de SiO_2 por alveolo en función del tratamiento (Tabla 9) con una pipeta de precisión sobre la base del tallo de cada plántula (Figura I. 21).

El inóculo de *Pc* se elaboró según el protocolo de Jung (Jung et al. 1996). Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 1L y en cada matraz se añadieron 500 cm^3 de vermiculita, 40 cm^3 de granos de avena enteros y 350 ml de preparado V_8. Los matraces fueron agitados hasta conseguir una mezcla homogénea, se sellaron herméticamente y se introdujeron en la máquina de autoclave para la esterilización y desinfección a 121ºC durante 20 min. Una vez enfriados los matraces se volvieron a autoclavar para una mejor esterilización. Pasadas 24 horas, para cada matraz se introdujeron entre 4-5 “plugs” de 0,5 cm de diámetro con micelio activo de *Pc* (Figura I. 22). Todo el proceso se llevó a cabo dentro de una cámara de flujo laminar horizontal. Finalmente, tras la adicción del patógeno, los matraces se incubaron en una cámara frigorífica durante 5 semanas a una temperatura de 22ºC (condiciones óptimas para el crecimiento del patógeno).

El proceso de infestación del suelo se realizó el 6 de mayo de 2019 pasadas cuatro semanas desde la inoculación con las cepas de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2, donde se volvió previamente a medir el crecimiento de las plántulas (Figura I. 23). En primer lugar, el inóculo fue enjuagado con agua destilada para eliminar el exceso de azúcares. El suelo fue infestado usando una cuchara para mezclar cuidadosamente 12 ml

de inóculo en los primeros 3 cm de suelo de cada planta (Figura I. 24). Después de la inoculación, las plantas se regaron ligeramente y se inundaron al día siguiente durante 48 horas con agua sin cloro para estimular la producción de esporangios y la liberación y propagación de zoosporas (Figura I. 25). Cada mes hasta el final del experimento (2 de septiembre de 2019), las plantas se inundaban durante 48 horas y todas las bandejas se colocaron individualmente en recipientes grandes de plástico (58 cm × 38 cm × 40 cm, 88 l). Se realizó una evaluación semanal de la mortalidad de las plántulas durante 4 meses (Figura I. 26 y Figura I. 27).

En septiembre de 2019, al final del experimento, se volvió a medir la altura de las plantas supervivientes inoculadas y no inoculadas con *Pc* sometidas a los diferentes tratamientos con las cepas de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos para cada uno de los seis ensayos se realizó mediante un modelo lineal general (GLM), considerándose como variables dependientes el *crecimiento miceliar*, la *pudrición de hoja* y el *número de esporangios*, y como variables independientes el *tratamiento*, el *tiempo* y su *interacción*. Para la evaluación de la mortalidad de las plantas se utilizó el modelo GLZ (General Linear/ Nonlinear Models) considerando como variable binomial la *mortalidad* (0=viva, 1=muerta) y como variables independientes el *tratamiento*, el *tiempo* y su *interacción*. Para analizar el tiempo hasta la muerte de las plantas inoculadas con *Pc* sometidas a los distintos tratamientos y comparar las probabilidades de supervivencia, se utilizó el análisis del tiempo de supervivencia basado en la estimación de Kaplan-Meier (Solla et al., 2011). Se utilizó el programa STATISTICA V.10. y se usó el programa Excel para la representación de varias figuras.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

En este apartado se reflejan los resultados obtenidos en el laboratorio de investigación y en el invernadero para los distintos tratamientos "*in vitro*" e "*in planta*".

4.1. Efecto *in vitro* de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 ante *Pc*

4.1.1. Crecimiento miceliar de *Pc* en placa de Petri en medio con SiO_2

No se obtuvieron diferencias significativas de crecimiento de *Pc* entre los tratamientos con diferentes concentraciones de sílice (Tabla 10). El crecimiento medio para los seis días evaluados por cada tratamiento fue similar. El tratamiento control (0 g/L $Si0_2$) mostró un crecimiento medio de 2,7 cm, y los tratamientos 0,5, 1 y 2 g/L $Si0_2$ mostraron crecimientos de 2,61, 2,62 y 2,63 cm, respectivamente.

En la figura 1 se muestra el crecimiento miceliar diario de *Pc*. No hay diferencias significativas para los días 2, 3, 4 y 6, aunque sí se observaron diferencias significativas, no sustanciales, para los días 1 y 5 entre el control (0 g/L de SiO_2) y el tratamiento con 0,5 g/L de SiO_2 y el control y el tratamiento con 2 g/L de SiO_2, respectivamente.

Tabla 10. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis del crecimiento miceliar de *Pc* en placa de Petri usando diferentes concentraciones de SiO_2.

Efecto	Grados de Libertad	*F*-ratio / χ^2	Valor *P*
Tratamiento	3	0,7	0,534
Réplica (Tratamiento)[a]	8	2,5	0,029
Día	4	11801,8	0,000
Día x Tratamiento	12	1,5	0,149

[a]Réplica anidada dentro del tratamiento.

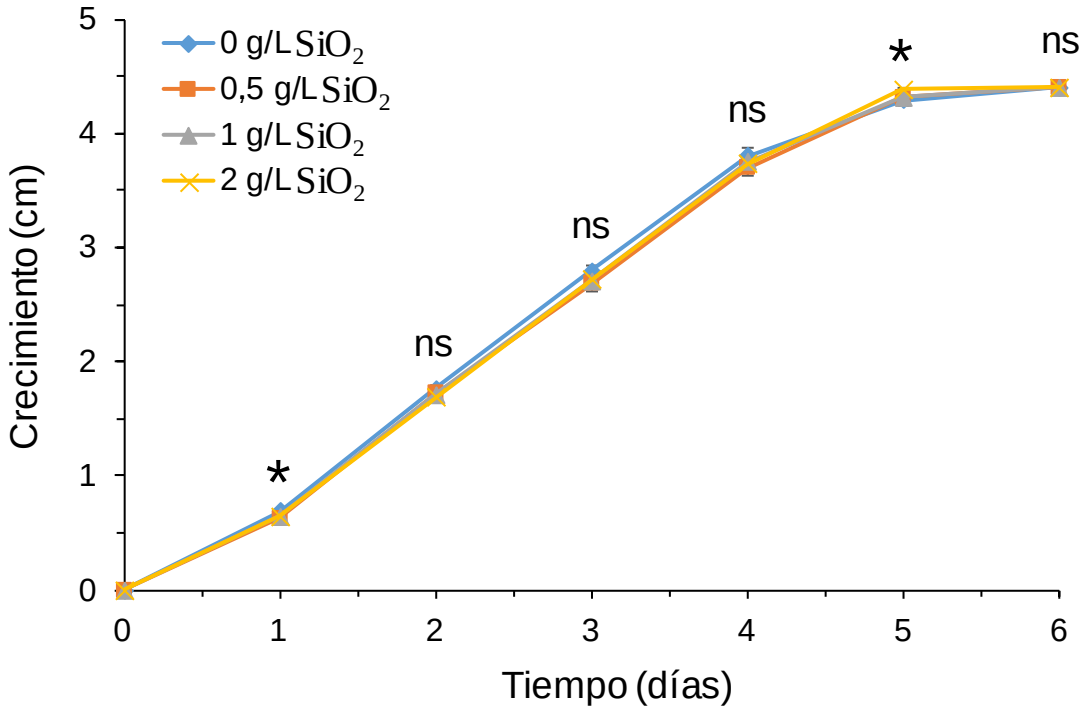


Figura 1. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio V_8 usando cuatro tratamientos con distintas concentraciones de SiO_2 (0 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L) en placas de Petri. * = diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$); ns = sin diferencias significativas entre tratamientos.

Cuando el control (0 g/L de SiO_2) alcanzó el borde la placa a los seis días, se repicó de nuevo el ensayo. En este caso se observaron diferencias significativas, pero no sustanciales, entre tratamientos con diferentes concentraciones de sílice (Tabla 11, Figura 2).

El crecimiento medio para los seis días evaluados por cada tratamiento fue de 2,95 cm para el control (0 g/L de SiO_2) y 2,99 cm para el de 2 g/L SiO_2 *vs*. 2,76 cm para los tratamientos de 0,5 g/L y 1 g/L SiO_2.

Tabla 11. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis del crecimiento miceliar de *Pc* en placa de Petri usando diferentes concentraciones de SiO_2.

Efecto	Grados de Libertad	*F*-ratio / χ^2	Valor *P*
Tratamiento	3	4,7	0,007
Réplica (Tratamiento)[a]	8	3,6	0,004
Día	4	6224,9	0,000
Día x Tratamiento	12	3,1	0,001

[a]Réplica anidada dentro del tratamiento.

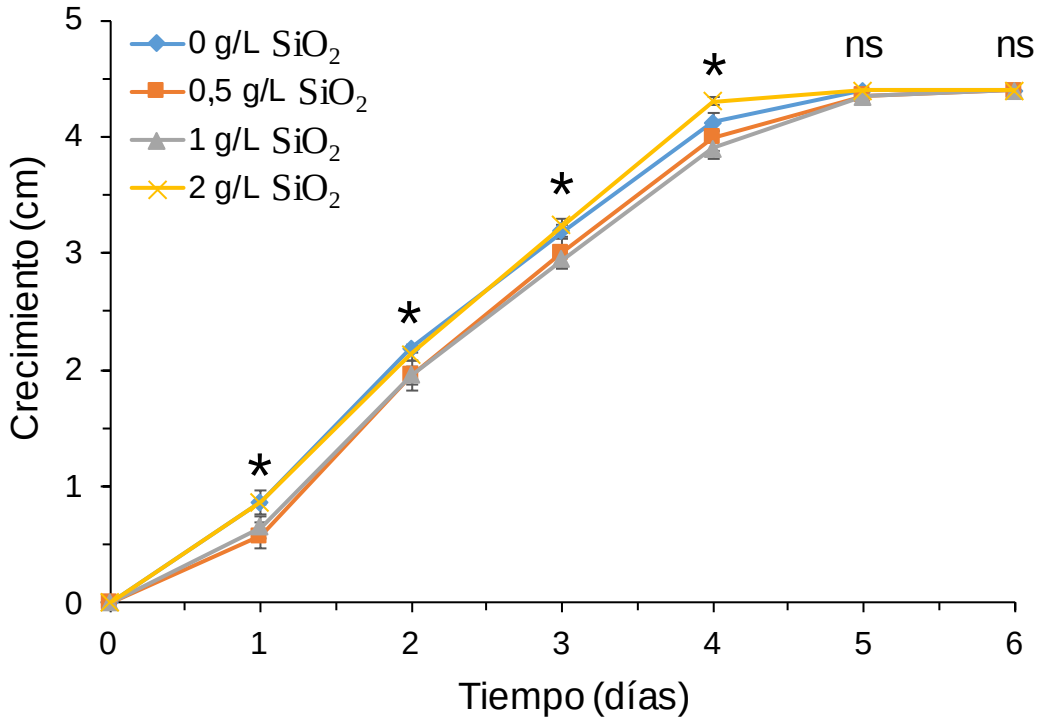


Figura 2. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio V_8 usando cuatro tratamientos con distintas concentraciones de SiO_2 en placas de Petri repicadas; * = diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$); ns = sin diferencias significativas entre tratamientos.

4.1.2 Crecimiento miceliar de *Pc* en medio conteniendo diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*

B. amyloliquefaciens inhibió el crecimiento del micelio de *Pc* según los resultados que se muestran en la tabla 12 y figura 3.

El crecimiento medio del micelio de *Pc* para los diez días evaluados fue significativamente diferente para cada tratamiento: 3,67 cm para el control *vs.* 1,33 cm para *B. amyloliquefaciens* ISB05 *vs.* 3,01 cm para *B. amyloliquefaciens* ISB06.

En la figura 3 que muestra el crecimiento miceliar diario de *Pc*, se observó que desde el día 1 existieron diferencias significativas en cuanto al crecimiento entre los tres tratamientos considerados. Especialmente la cepa *B. amyloliquefaciens* ISB05 redujo el crecimiento de *Pc* hasta un 63% con respecto al control.

Tabla 12. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis del crecimiento miceliar de *Pc* en placa de Petri usando diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*.

Efecto	Grados de Libertad	*F*-ratio / χ^2	Valor *P*
Tratamiento	2	4028,2	0,000
Réplica (Tratamiento)[a]	6	8,5	0,000
Día	8	305,1	0,000
Día x Tratamiento	16	3,1	0,000

[a]Réplica anidada dentro del tratamiento.

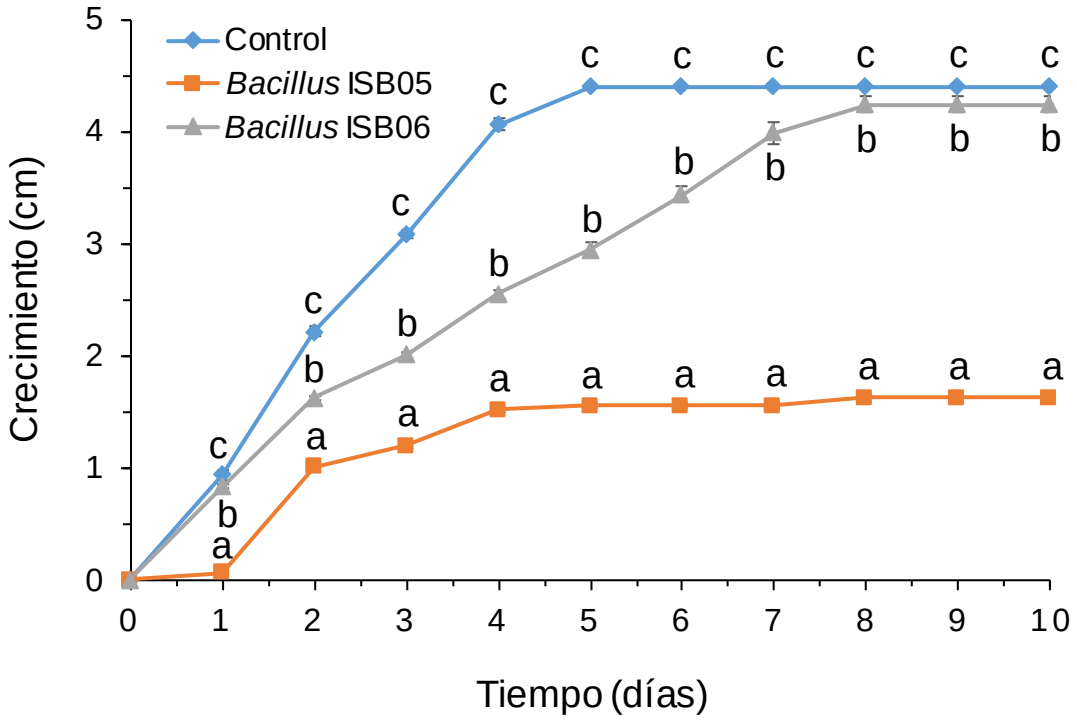


Figura 3. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio PDA en placas de Petri, usando tres tratamientos diferentes: tratamiento control (sin *B. amyloliquefaciens*), 0.5 g/L de *B. amyloliquefaciens* ISB05 y 0.5 g/L *B. amyloliquefaciens* ISB06. Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0{,}001$) según el test de Fisher LSD.

4.1.3. Crecimiento miceliar de *Pc* en medio con SiO_2 en placas de Petri montadas sobre otras placas con *B. amyloliquefaciens*

B. amyloliquefaciens inhibió el crecimiento del micelio de *Pc* según los resultados que se muestran en la tabla 13. En la figura 4 se detalla el crecimiento miceliar diario de *Pc*, enfrentada a diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* y diferentes concentraciones de SiO_2. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

El crecimiento medio del micelio de *Pc* para los diez días teniendo solo en cuenta el efecto de *B. amyloliquefaciens* fue significativamente diferente para cada tratamiento: 2,25 cm el tratamiento control *vs.* 1,00 cm *Bacillus* ISB05 *vs.* 1,56 cm *Bacillus* ISB06. En la figura 5 se observa que desde el día 1 existieron diferencias significativas en cuanto al crecimiento entre los tres tratamientos considerados.

Finalmente, teniendo en cuenta solo el efecto del SiO_2 se observaron diferencias significativas, pero no sustanciales (Figuro 6). El crecimiento medio por tratamiento fue

de 1,67 cm a excepción del tratamiento 1 g/L (1,45 cm). La reducción significativa del crecimiento de *Pc* con este último tratamiento se produjo en los últimos días del ensayo (Figura 6).

Tabla 13. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis del crecimiento miceliar de *Pc* con diferentes concentraciones de SiO_2 en placa de Petri y enfrentado a diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* y diferentes concentraciones de SiO_2.

Efecto	Grados de Libertad	*F*-ratio / χ^2	Valor *P*
Tratamiento	11	105,8	0,000
Réplica (Tratamiento)[a]	24	3,8	0,000
Día	8	1991,6	0,000
Día x Tratamiento	88	33,5	0,000

[a]Réplica anidada dentro del tratamiento.

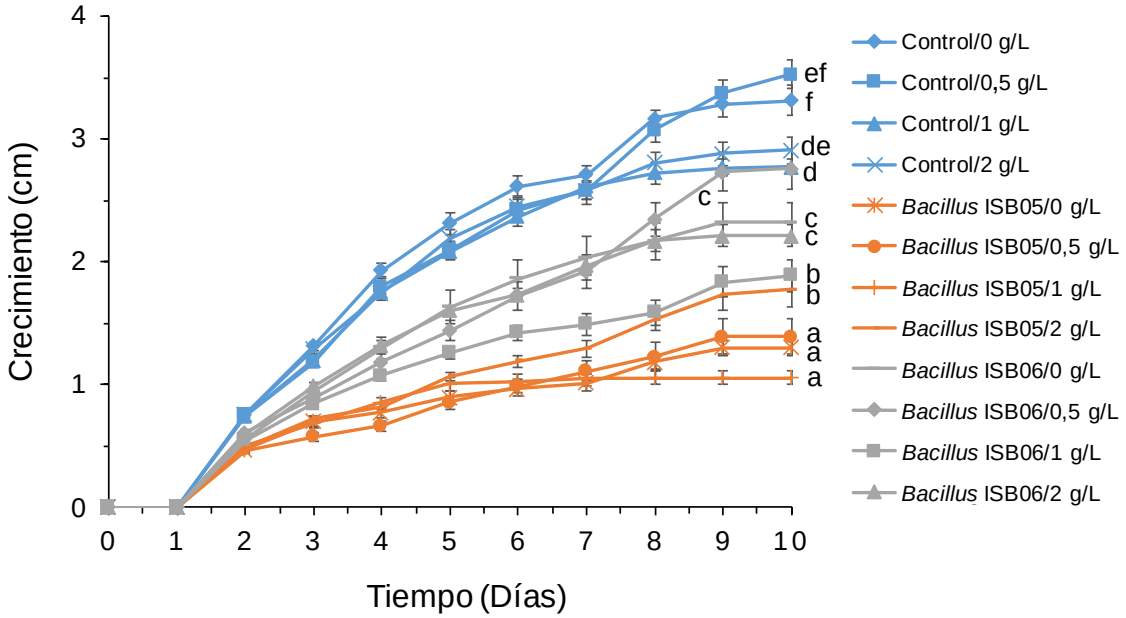


Figura 4. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio PDA en placas de Petri con diferentes concentraciones de SiO_2 enfrentado a diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* y diferentes concentraciones de SiO_2. Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,01$) según el test de Fisher LSD.

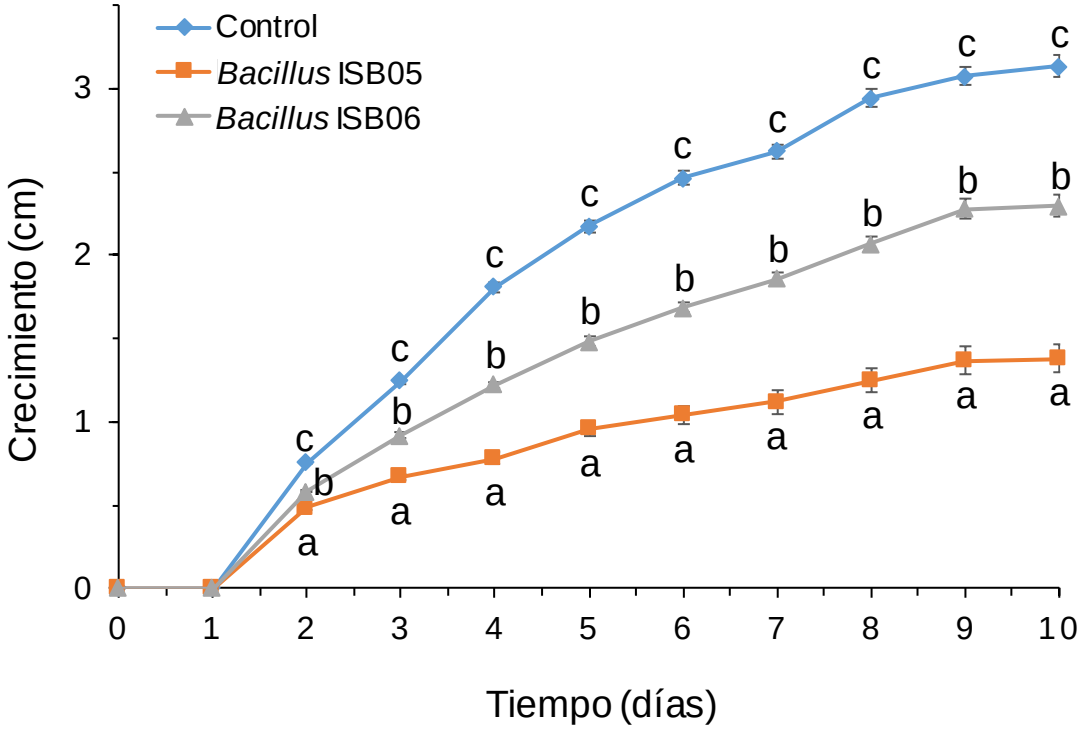


Figura 5. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio PDA en placas de Petri teniendo solamente en cuenta el efecto de las cepas de *B. amyloliquefaciens* (ISB05 e ISB06). Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0{,}001$) según el test de Fisher LSD.

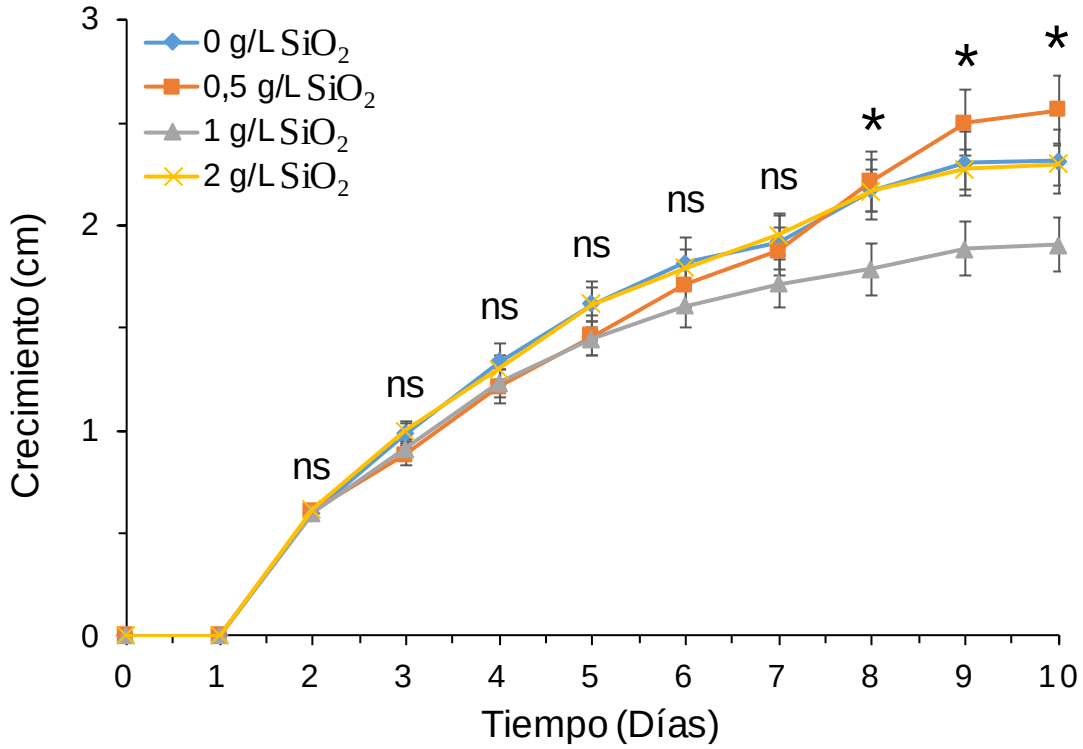


Figura 6. Crecimiento miceliar diario de *Pc* en medio PDA en placas de Petri teniendo en cuenta solo el efecto de las diferentes concentraciones de SiO_2. * = diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0{,}05$); ns = sin diferencias significativas entre tratamientos.

4.1.4. Número de lesiones de *Pc* en hoja tras la pulverización individual y combinada de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens*

Los tratamientos con SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* redujeron la pudrición de hojas de alcornoque (Tabla 14).

En la figura 7 se muestran los resultados de como afectaron los tratamientos combinados de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* tras pulverizar hojas de alcornoque e introducirlas posteriormente en una suspensión de zoosporas. Se observaron las mayores diferencias significativas entre el tratamiento con la cepa ISB05 de *B. amyloliquefaciens* y las concentraciones de 0,5 y 1 g/L de SiO_2 (20%) en comparación con el tratamiento control, con una pudrición del 66%.

En la figura 8 se observa que la aplicación de las diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* disminuye la pudrición de las hojas de alcornoque evaluadas. Es decir, teniendo solo en cuenta el efecto de *B. amyloliquefaciens*, se vio que la pudrición de las hojas fue diferente para cada tratamiento, con un porcentaje del 43% para el tratamiento control *vs.* 15% *Bacillus* ISB05 *vs.* 20 % *Bacillus* ISB06.

En cuanto a los efectos aislados del SiO_2 se observaron diferencias significativas entre tratamientos, siendo los tratamientos 0,5 g/L y 1 g/L de SiO_2 con un porcentaje de 23% y 22% respectivamente, los menos afectados por las zoosporas en suspensión de *Pc* (Figura 9).

Tabla 14. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis de pudrición de hojas de alcornoque tras la pulverización individual y combinada de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* y posteriormente sumergidas en zoosporas de *Pc*.

Efecto	Grados de Libertad	*F*-ratio / χ^2	Valor *P*
Tratamiento	11	7,46	0,000
Réplica	2	0,42	0,658
Tratamiento x Réplica	22	1,09	0,366
Covariables			
Altura (cm)	1	2,81	0,096

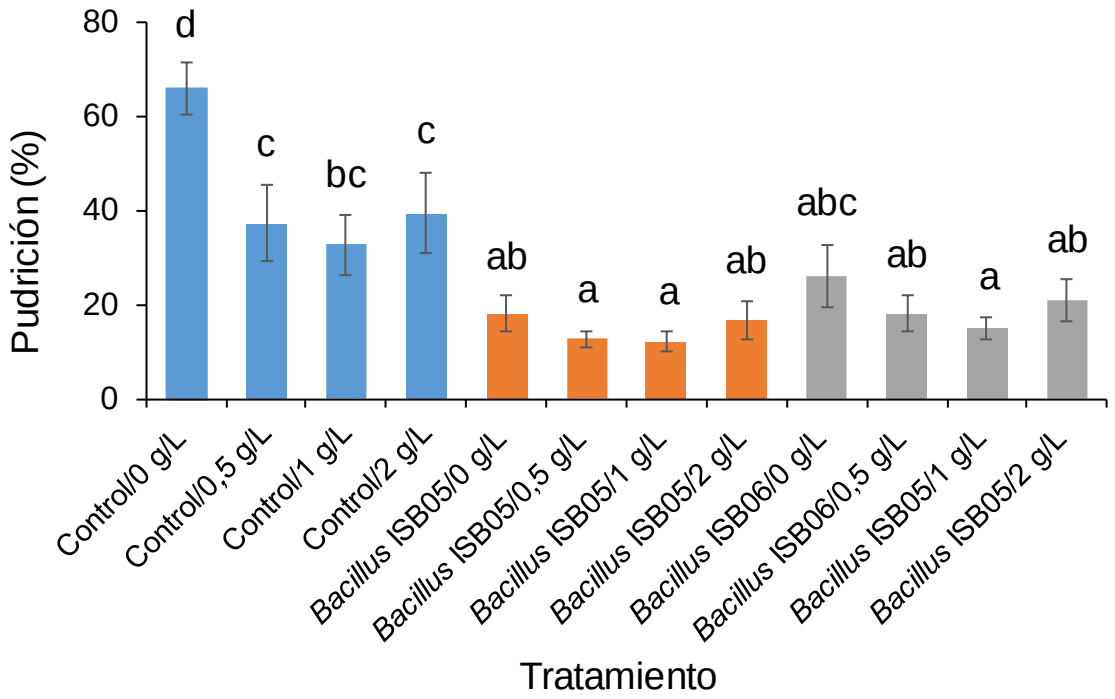


Figura 7. Porcentaje de pudrición de hojas de *Q. suber* pulverizadas con diferentes concentraciones de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* e introducidas posteriormente en una suspensión de zoosporas de *Pc*. Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0{,}001$) según el test de Fisher LSD.

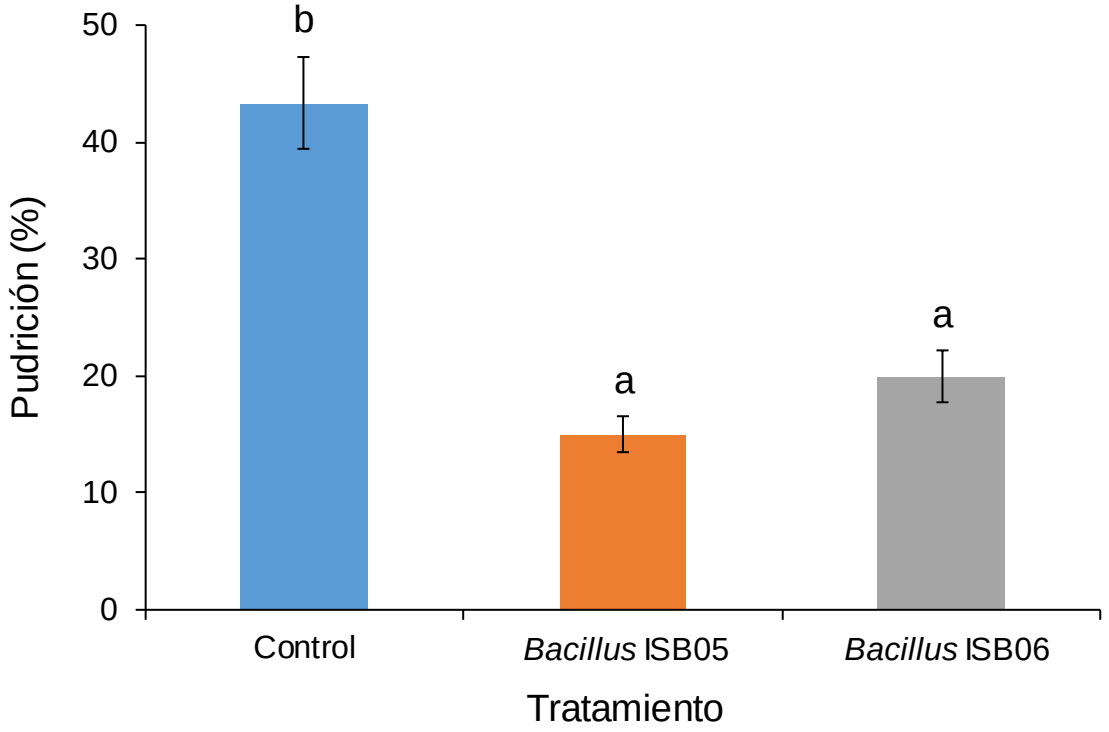


Figura 8. Porcentaje de pudrición de hojas de *Q. suber* teniendo solo en cuenta el efecto de las cepas de *B. amyloliquefaciens* (ISB05 e ISB06). Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0{,}01$) según el test de Fisher LSD.

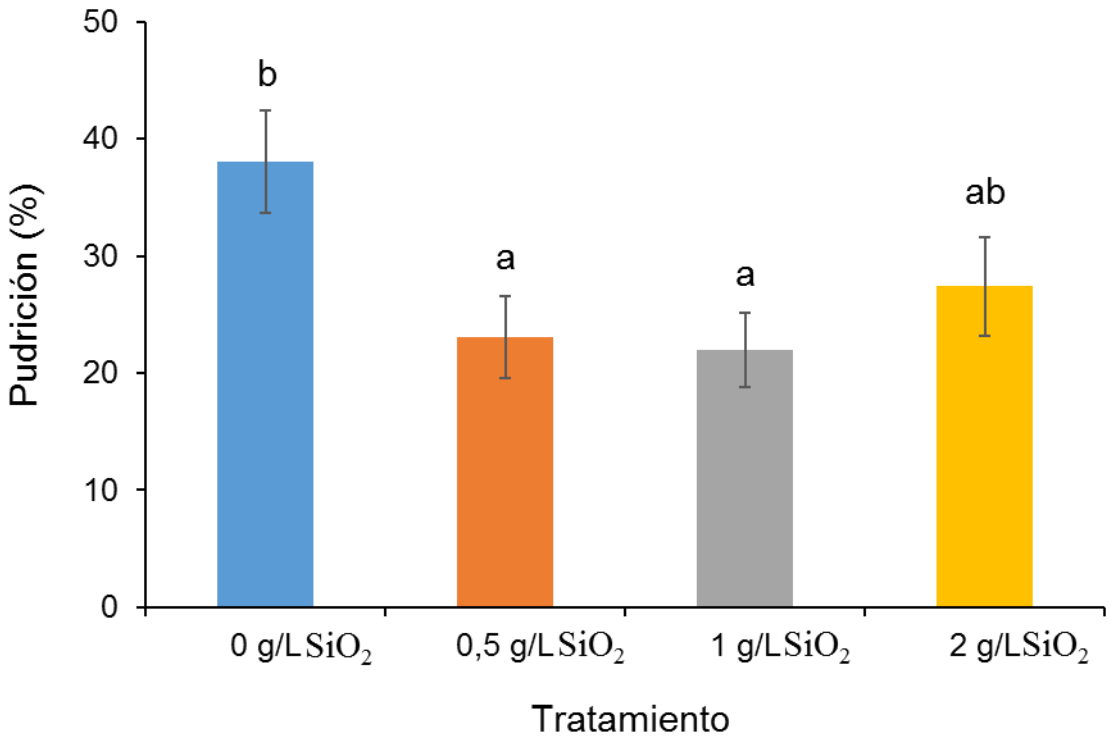


Figura 9. Porcentaje de pudrición de hojas de *Q. suber* teniendo en cuenta solamente el efecto de las diferentes concentraciones de SiO_2. Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$) según el test de Fisher LSD.

4.1.5. Formación de esporangios en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri

El suelo inoculado con *B. amyloliquefaciens* ISB05 tuvo un efecto inhibidor en la formación de esporangios de *Pc*, de ahí las diferencias significativas entre tratamientos que se muestran en la tabla 15.

Para el día 0 no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Para el día 15 hay diferencias significativas entre los tratamientos con la cepa ISB05 de *B. amyloliquefaciens* y el resto de tratamientos. El día 30 mostró diferencias significativas entre el Control (0g/L SiO_2) y los tratamientos con *Bacillus* ISB05, cuya concentración fue de 0,5 y 1 g/L SiO_2 y para el día 45 tampoco se observó ninguna diferencia significativa entre tratamientos (Figura 10). Se observó además que los tratamientos con la cepa ISB05 de *B. amyloliquefaciens* mostraron diferencias significativas entre días evaluados (0, 15, 30 y 45) (Figura 10), siendo el día 15 en el que se observó un menor número de esporangios.

Teniendo en cuenta el efecto día (Figura 11) observamos que hay diferencias significativas entre el día 15 y el resto de los días. Teniendo en cuenta solo el efecto de las diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* (Figura 12), se vio que la cepa ISB05 redujo el número de esporangios de forma significativa. En cuanto a los efectos aislados del SiO_2 no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 13).

Tabla 15. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis de la formación de esporangios de "plugs" de *Pc* en placa de Petri usando solución de suelo con diferentes tratamientos.

Efecto	Grados de Libertad	*F*-ratio / χ^2	Valor *P*
Tratamiento	11	3,88	0,000
Plug (Tratamiento)[a]	11	1,29	0,260
Medida (Plug)	4	2,46	0,059
Día	3	7,40	0,000
Día x Tratamiento	33	0,68	0,904
Día x Plug (Tratamiento)	33	1,64	0,026

[a]Réplica anidada dentro del tratamiento.

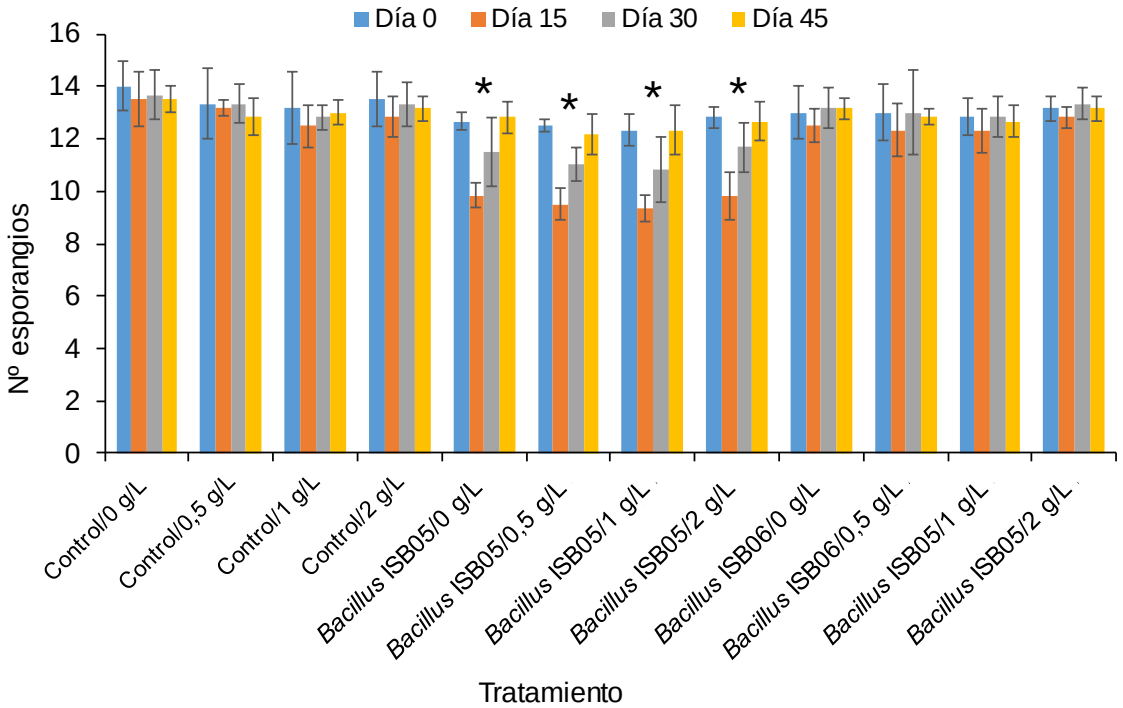


Figura 10. Número de esporangios observados en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri en los días: 0, 15, 30 y 45, teniendo además en cuenta todos los tratamientos utilizados. * = diferencias significativas entre días evaluados ($P < 0,001$).

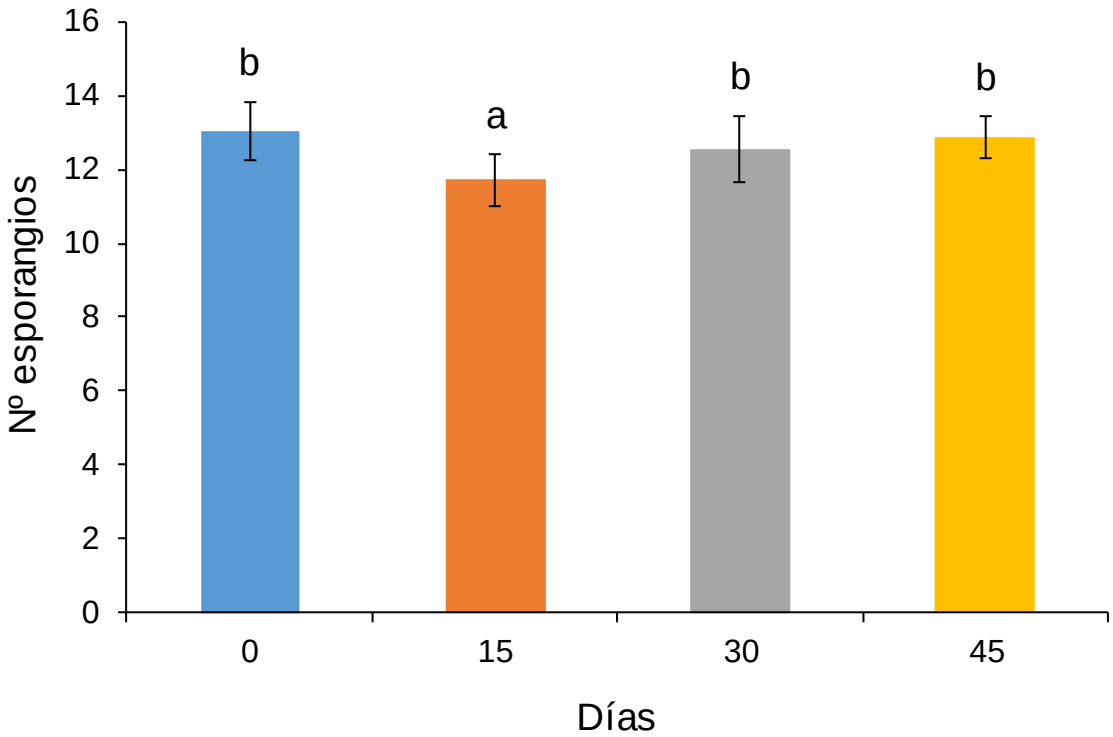


Figura 11. Número medio de esporangios observados en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri teniendo solamente en cuenta el efecto de los días de análisis del ensayo. Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0{,}01$) según el test de Fisher LSD.

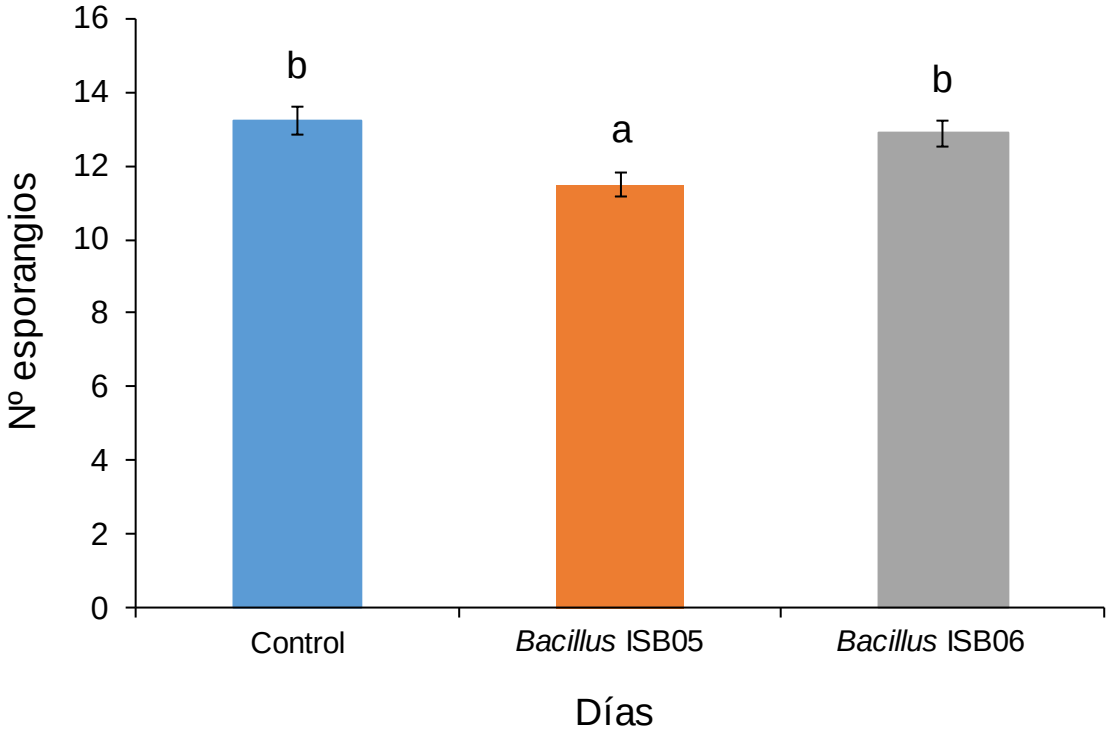


Figura 12. Número medio de esporangios observados en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri teniendo solamente en cuenta el efecto de las cepas de *B. amyloliquefaciens* (ISB05 e ISB06). Las barras horizontales son errores estándar y las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0{,}01$) según el test de Fisher LSD.

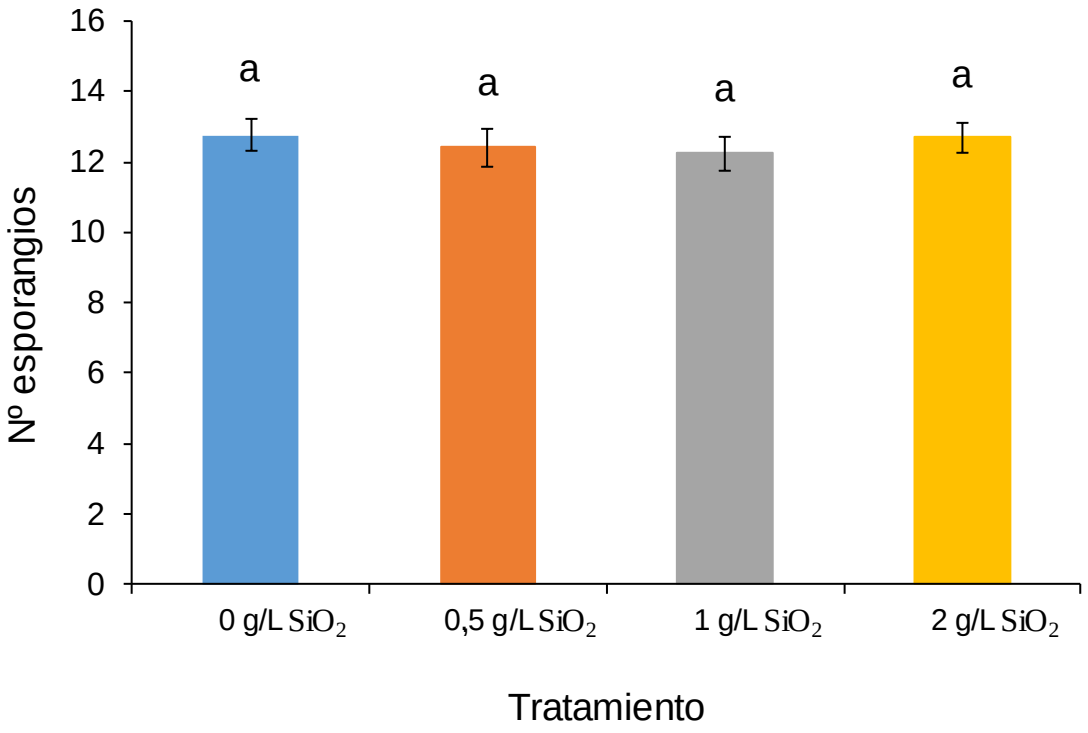


Figura 13. Número medio de esporangios observados en "plugs" de *Pc* dentro de placas de Petri teniendo en cuenta solamente el efecto de las diferentes concentraciones de SiO_2. Las barras horizontales son errores estándar y las letras iguales indican no diferencias significativas entre tratamientos (P < 0,85) según el test de Fisher LSD.

4.2. Evaluación en planta de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 ante *Pc*

4.2.1. Efecto de los tratamientos en la altura de las plantas

Previamente a inocular con *B. amyloliquefaciens* y SiO_2 se realizaron las primeras mediciones de la altura de las plantas (Tabla 16). Hubo diferencias entre especies y árboles madre, y las alturas fueron mayores en aquellas plantas de mayor peso de bellota (r=0,47; P <0.001) y que germinaron antes (r=-0,53; P <0.001) (Tabla 16).

Previamente a inocular con *Pc* se realizaron las segundas mediciones de la altura de las plantas. No se observó un efecto significativo de la sílice ni de *B. amyloliquefaciens* en estos segundos valores de altura de las plantas (Tabla 17). Sí hubo diferencias entre especies, y las alturas fueron mayores en aquellas plantas de mayor peso de bellota (r=0,48; P <0.001) y que germinaron antes (r=-0,51; P <0.001) (Tabla 17).

Al final del ensayo (2 de septiembre de 2019) se realizó la tercera medición de la altura de las plantas. En planta no inoculada con *Pc*, se observó un efecto significativo de los tratamientos (Tabla 18), de modo que la sílice incrementó 9,6% la altura de las plantas (17,1±0,4 y 15,6±0,5 cm respectivamente), y *Bacillus ISB05* y *Bacillus ISB06* incrementaron 12,8 y 10,9% la altura de las plantas (17,6±0,6, 17,3±0,6 y 15,6±0,5 cm respectivamente). El mayor incremento en altura se observó para la combinación de tratamientos SiO_2 + *Bacillus* ISB6 (Figura 14). Las tres especies mostraron un comportamiento distinto ante los tratamientos (interacción especie × sílice × *Bacillus* marginalmente significativa en la Tabla 18; $P = 0.093$). Así como *C. sativa* reaccionó positivamente a ambos tratamientos, la altura de *Q. ilex* se incrementó con *B. amyloliquefaciens*, pero fue indiferente al SiO_2 (Figura 15). La altura de *Q. suber* también fue indiferente al SiO_2 salvo si se combinó con *Bacillus* ISB06 (Figura 15). Las alturas fueron mayores en aquellas plantas de mayor peso de bellota (r=0,49; $P < 0.001$) y que germinaron antes (r=-0,45; $P < 0.001$) (Tabla 18).

En el análisis conjunto de todas las mediciones en plantas no inoculadas con *Pc* (análisis de medidas repetidas) se validó el efecto significativo de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* en las alturas de las plantas. Destacamos que la interacción significativa fecha × especie observada se debió al mayor incremento en altura de *Q. suber*, al final del periodo vegetativo, en relación a las otras dos especies (Figura 16).

Tabla 16. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis de la altura de plantas de *Q. suber*, *Q. ilex* y *C. sativa* previamente a la inoculación con los diferentes tratamientos de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens*.

Efecto	Grados de Libertad	*F*-ratio / χ^2	Valor *P*
Efecto aleatorio			
Árbol madre (Especie)	3	2,66	0,047
Efecto fijo			
Especie	2	60,25	0,003
Sílice	1	0,82	0,367
Especie*Sílice	2	0,63	0,532
Covariables			
Peso semilla (g)	1	147,85	0,000
Tiempo hasta emerger	1	68,08	0,000

Tabla 17. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis de la altura de plantas de *Q. suber, Q. ilex y C. sativa* previamente a la inoculación con *Pc*.

Efecto	Grados de Libertad	*F*-ratio / χ^2	Valor *P*
Efecto aleatorio			
Árbol madre (Especie)	3	2,27	0,079
Efecto fijo			
Especie	2	54,71	0,003
Sílice	1	1,95	0,163
B. amyloliquefaciens	2	0,97	0,381
Especie*Sílice	2	0,45	0,639
Especie**B. amyloliquefaciens*	4	1,21	0,304
Sílice**B. amyloliquefaciens*	2	0,91	0,401
Especie*Sílice**B. amyloliquefaciens*	4	0,12	0,975
Covariables			
Peso semilla (g)	1	156,17	0,000
Tiempo hasta emerger	1	63,185	0,000

Tabla 18. Resultados del modelo lineal general (GLM) para el análisis de la altura final de plantas no inoculadas con *Pc* de *Q. suber*, *Q. ilex* y *C. sativa*.

Efecto	Grados de Libertad	*F*-ratio / χ^2	Valor *P*
Efecto aleatorio			
Árbol madre (Especie)	3	0,35	0,789
Efecto fijo			
Especie	2	64,68	0,001
Sílice	1	4,60	0,033
B. amyloliquefaciens	2	5,50	0,005
Especie*Sílice	2	0,67	0,513
Especie**B. amyloliquefaciens*	4	0,07	0,990
Sílice**B. amyloliquefaciens*	2	0,58	0,560
Especie*Sílice**B. amyloliquefaciens*	4	2,01	0,094
Covariables			
Peso semilla (g)	1	24,41	0,000
Tiempo hasta emerger	1	21,03	0,000

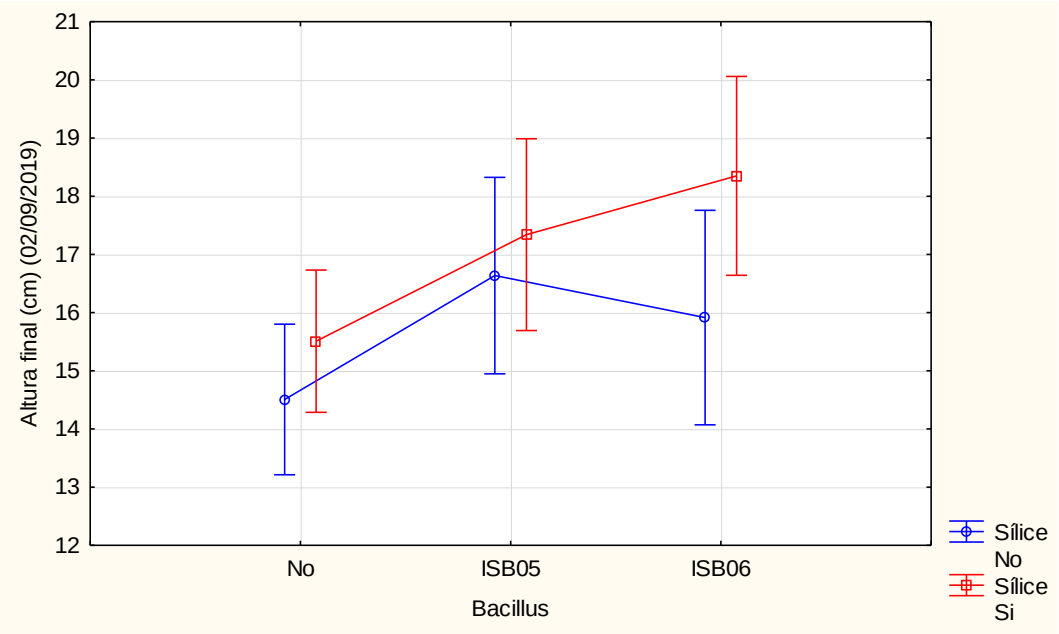


Figura 14. Altura final media de las plantas de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* no inoculadas con *Pc* ante los tratamientos cruzados con y sin SiO_2 y con y sin *B. amyloliquefaciens* (ISB05 y ISB06).

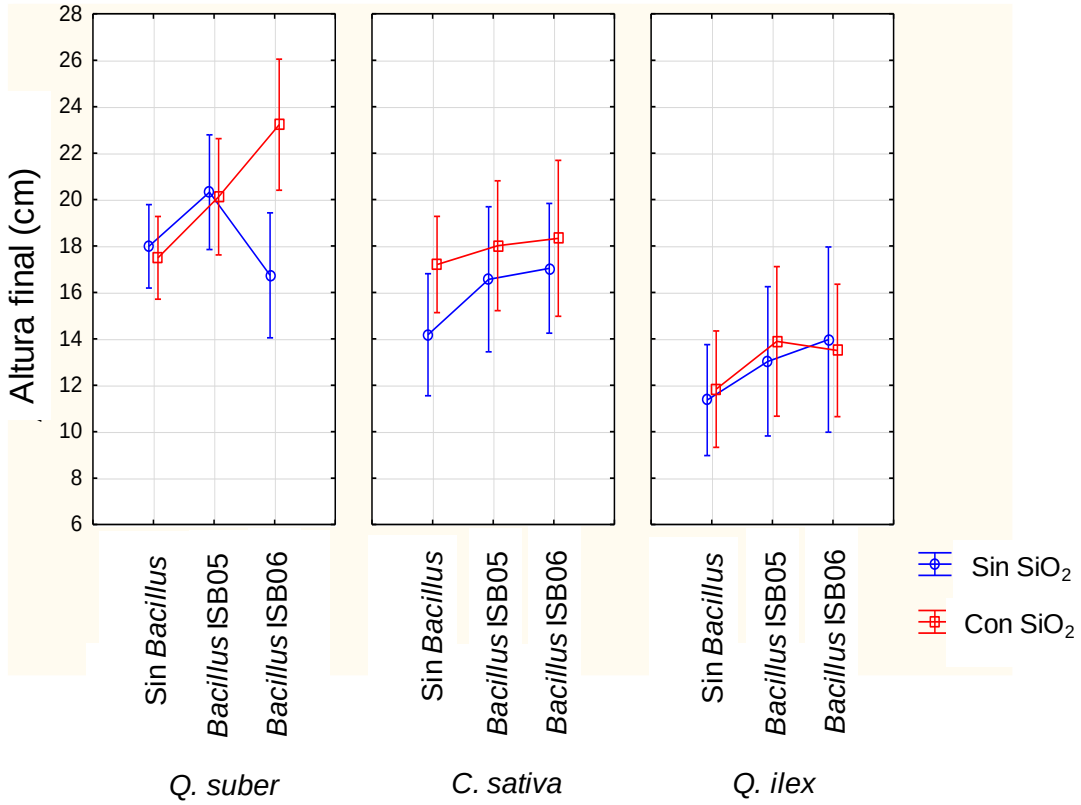


Figura 15. Altura final de las plantas *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber*, no inoculadas con *Pc*, ante los diferentes tratamientos.

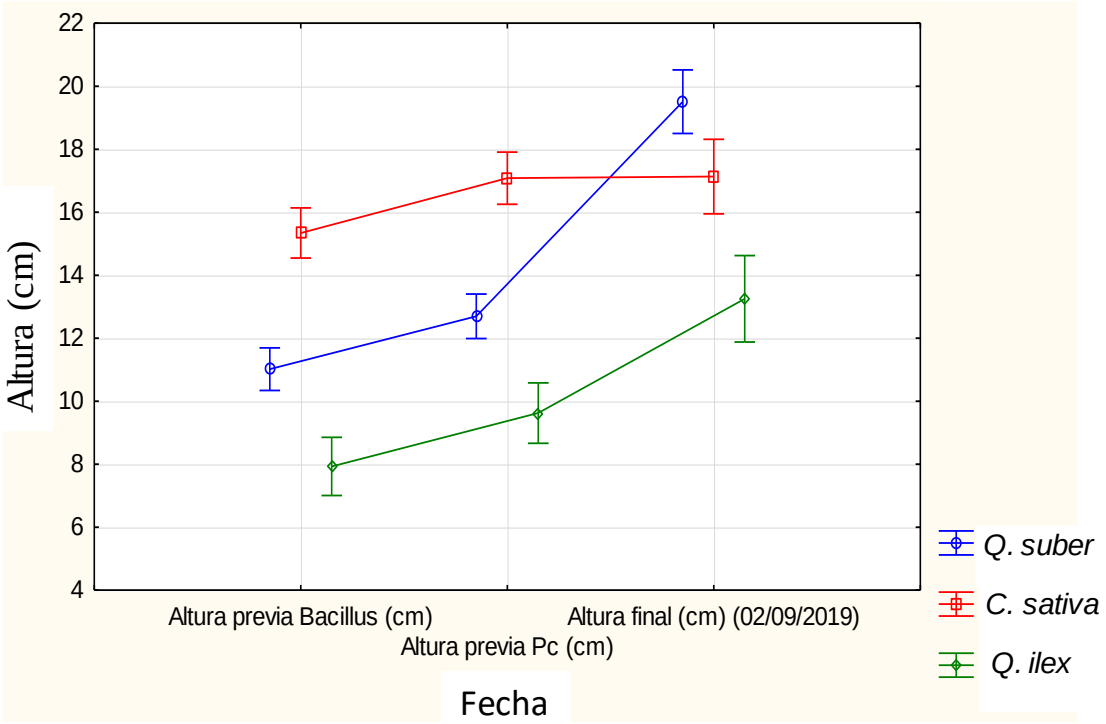


Figura 16. Análisis conjunto de las alturas medias de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* no inoculadas con *Pc*. La altura se medió en tres momentos, antes de los tratamientos usando *B. amyloliquefaciens* y SiO_2, antes de la inoculación con *Pc* del resto de plantas y al final del experimento.

4.2.2. Efecto de los tratamientos en la tolerancia de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* a *Pc*

Al final del ensayo (2 de septiembre de 2019), la mortalidad de castaños, encinas y alcornoques por efecto exclusivo de *Pc* fue 100%, 56% y 3%, respectivamente, con diferencias significativas entre las tres especies ($P < 0.001$; Figura 17). El análisis GLZ (General Linear/ Nonlinear Models) conjunto de las tres especies considerando la variable binomial mortalidad (0=viva, 1=muerta) no indicó interacciones significativas entre los tratamientos y las plantas. Por este motivo, los análisis de mortalidad se realizaron separadamente por especies. No se registró mortalidad en la planta sin inocular con *Pc* para ninguna de las tres especies. En consecuencia, no se incluyó la planta control, cuya mortalidad varió cero entre los tratamientos, en el análisis de supervivencia.

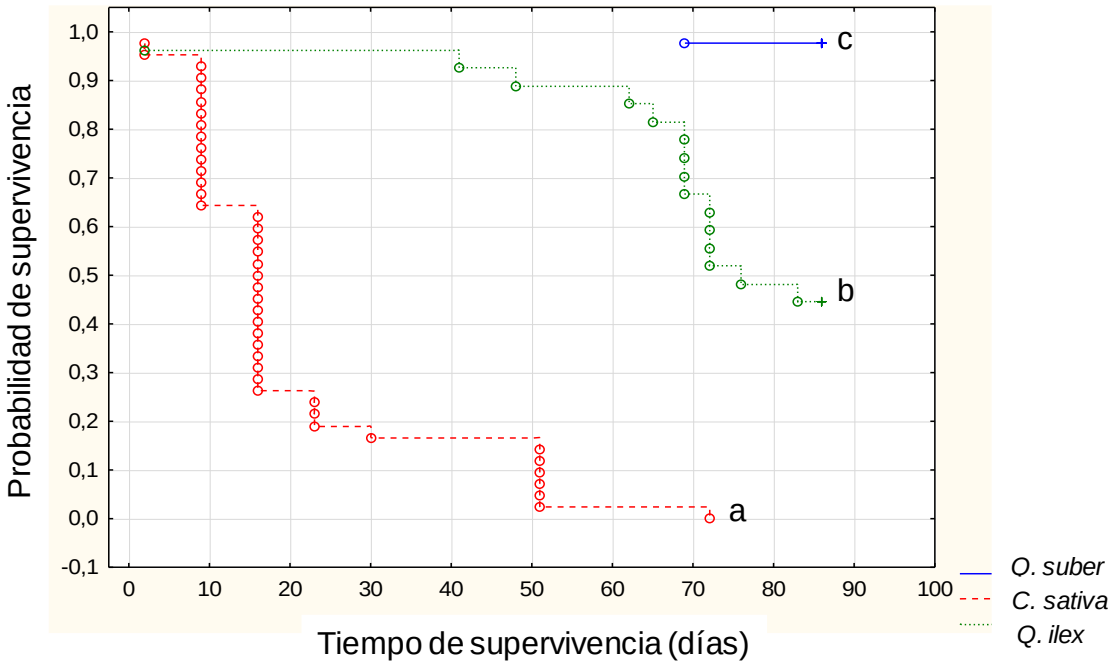


Figura 17. Probabilidad de supervivencia de las tres especies (castaño, encina y alcornoque) considerando las que se han muerto exclusivamente por *Pc*. Las letras indican diferencias significativas entre especies ($P < 0.001$).

Las curvas de supervivencia para el efecto de la sílice en *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, al igual que tampoco se observaron diferencias significativas en las curvas de supervivencias que mostraban el efecto de las diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*. En ninguna especie, ninguno de los seis tratamientos (Control, Sílice, *Bacillus* ISB05, *Bacillus* ISB06, sílice + *Bacillus* ISB05, sílice + *Bacillus* ISB06) fue más favorable en términos de supervivencia para las plantas inoculadas (Figura 18; $P > 0.01$).

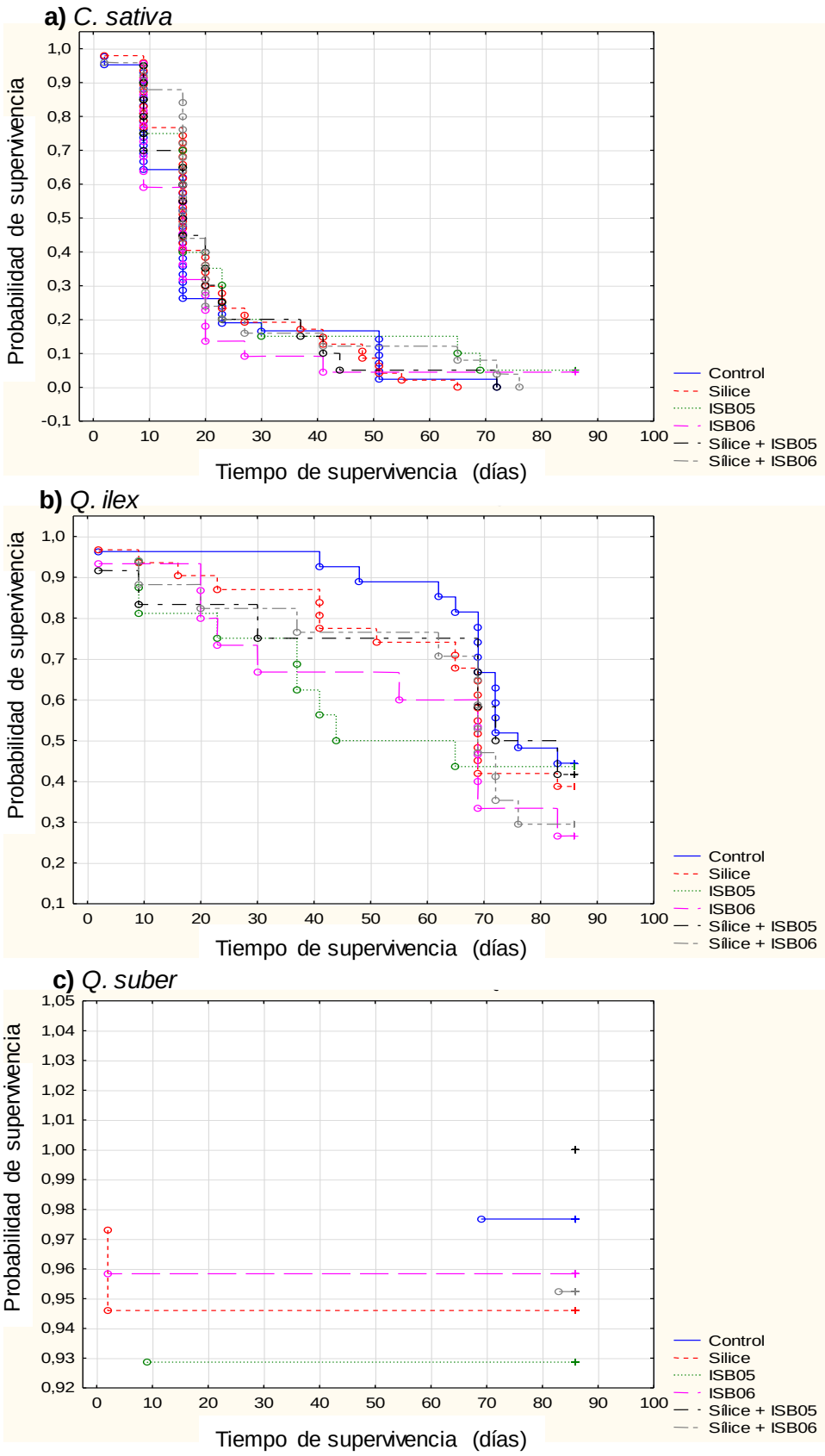


Figura 18. Probabilidad de supervivencia de las tres especies (castaño, encina y alcornoque) considerando las que se han muerto exclusivamente por *Pc* teniendo en cuenta los 6 tratamientos considerados. **a)** *C. sativa* (*P* = 0,454); **b)** *Q. ilex* (*P* = 0,488); **c)** *Q. suber* (*P* = 0,873).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. *Pc* en respuesta a la sílice y *B. amyloliquefaciens* en condiciones *in vitro*

En cuanto al efecto de las diferentes concentraciones de SiO_2 en el crecimiento miceliar de *Pc*, en general, los resultados mostraron que la sílice no frena el avance del patógeno. Esto podría ser debido a que el silicio no actúa directamente sobre el patógeno y sí lo hace indirectamente vía planta (Datnoff et al., 2001; Bathoova et al., 2018; Araújo et al., 2019). No obstante, en nuestro caso dos de los tratamientos utilizados (0,5 y 1 g/L de SiO_2) mostraron que la presencia de sílice en el medio de cultivo en placas de Petri redujo de forma significativa, pero no sustancial, el crecimiento de *Pc* con respecto al tratamiento control. En concordancia, Carneiro-Carvalho et al. (2017) observaron que para concentraciones superiores a 5 mM existía un porcentaje de inhibición que reducía el crecimiento de *Pc* en medio PDA.

Ambas cepas de *B. amyloliquefaciens* (ISB05 y ISB06) mostraron una buena actividad antifúngica reduciendo el crecimiento del micelio de *Pc* en condiciones *in vitro*. Estos resultados están en concordancia a los obtenidos en un trabajo similar que usando como agente biológico la cepa UTB2 de *B. amyloliquefaciens* redujo el crecimiento del micelio de *Aspergillus parasiticus* e inhibió la producción de ciertas toxinas en condiciones *in vitro* (Siahmoshteh et al., 2017). Parece ser que el efecto antifúngico de *B. amyloliquefaciens* no sólo se produce por un contacto directo con *Pc* (Tabla 12 y Figura 3), sino que de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla 13 y Figura 4) los volátiles desprendidos por *B. amyloliquefaciens*, en menor grado que el contacto directo, estarían frenando el crecimiento de *Pc*. Destacamos que la cepa ISB05 utilizada tuvo el mayor porcentaje de inhibición reduciendo en un 63% el crecimiento de *Pc* en contacto directo y reduciendo en un 58% el crecimiento de *Pc* con sus volátiles (Figura 3 y 5).

En concordancia a los resultados discutidos arriba, el suelo inoculado con la cepa efectiva (ISB05 de *B. amyloliquefaciens*) tuvo un efecto inhibidor en la formación de esporangios de *Pc* que redujo significativamente su formación durante los primeros 15 días tras la infestación del suelo (Figura 10). A partir del día 15 los tratamientos con la cepa ISB05 fueron perdiendo su efecto inhibidor con el tiempo. Esto *a priori* podría estar relacionado con el tiempo de persistencia de las cepas de *B. amyloliquefaciens* en

el suelo. Lee et al. (2015) evaluaron la eficacia de la cepa HK34 de *B. amyloliquefaciens* para sobrevivir y establecerse en el suelo, observando que la población bacteriana aumentó en el plazo de una semana y se mantuvo aproximadamente al mismo nivel hasta 4 semanas. Se ignora qué hubiera sucedido en una dehesa, pero debería ser objeto de investigación. Los tratamientos más efectivos en laboratorio fueron los de la cepa ISB05 combinada con 0,5 y 1 g/L SiO_2 (Figura 10), pero de nuevo se insiste en que habría que constatar este resultado en campo.

También al usar hojas de *Q. suber* pulverizadas con *B. amyloliquefaciens* y diferentes concentraciones de SiO_2 se observó una menor pudrición cuando éstas fueron sumergidas posteriormente en una suspensión de zoosporas, frente a las no tratadas. Lee et al. (2015) observaron que al tratar hojas de ginseng con la cepa HK34 de *B. amyloliquefaciens* se inducía una resistencia sistémica ante *Phytophthora cactorum*. A su vez, Carneiro-Carvalho et al. (2017) notó que la aplicación de Si en hojas de castaño redujo y retrasó significativamente la pudrición de éstas con respecto a las no tratadas ante *Pc*. Al igual que en el ensayo de infestación de suelo, los tratamientos en hoja más efectivos fueron los que usaron la cepa ISB05 combinada con 0,5 y 1 g/L SiO_2 (Figura 7), luego se aprecia una consistencia de resultados y un beneficio conjunto de ambos agentes de control. Probablemente, al igual que ocurrió en el ensayo anterior, *B. amyloliquefaciens* junto con el menor efecto del SiO_2, fue capaz de inhibir la formación de esporangios de *Pc*, traduciéndose en una menor pudrición de las hojas. Se ignora si los agentes actuaron directamente ante el patógeno o si hubo una modificación o inducción en la hoja que generara mayor protección.

En conjunto, los resultados obtenidos *in vitro* indican que las dos cepas de *B. amyloliquefaciens*, y en especial la cepa ISB05, podrían considerarse posibles agentes de biocontrol para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Lamentablemente, esta observación no se constató en planta inoculada.

5.2. *Pc* en respuesta a la sílice y *B. amyloliquefaciens* en condiciones en planta

Los beneficios de los efectos del Si en las plantas se asocian principalmente con su alto contenido en los tejidos vegetales, lo que aumenta su vigor y resistencia. Existen trabajos que prueban que la fertilización con Si en las plantas contribuye a aumentar la resistencia contra la infección por hongos patógenos mediante la estimulación de mecanismos de defensa (Datnoff et al., 2001; Bathoova et al. 2018; Araújo et al., 2019). Carneiro-Carvalho et al. (2017) mostró que la aplicación de Si en plantas de castaño hizo que aumentara su resistencia ante la infección por *Pc*, responsable de la enfermedad de la tinta. De igual manera, existen trabajos que usaron como un potencial agente de biocontrol diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* y que aplicadas en planta indujeron resistencia contra las enfermedades producidas por hongos patógenos (Lee et al., 2015; Siahmoshteh et al., 2017).

Nuestros resultados mostraron que la aplicación de sílice y las cepas ISB05 y ISB06 de *B. amyloliquefaciens* incrementó aditivamente la altura de *C. sativa* de una savia al final de su período vegetativo. Las dos cepas de *B. amyloliquefaciens* incrementaron la altura de *Q. ilex* y la cepa ISB06 en combinación con sílice incrementó sustancialmente la altura de *Q. suber* de una savia al final de su periodo vegetativo. No obstante, y a pesar de los efectos positivos como agentes de biocontrol reportados en la literatura, con las dosis utilizadas en este trabajo, ni la sílice ni las dos cepas de *B. amyloliquefaciens* redujeron significativamente la mortalidad de castaños, encinas y alcornoques ante *Pc*.

Las causas del por qué no se redujo la mortalidad se desconocen. Podrían estar relacionadas con el tiempo de persistencia de las cepas de *B. amyloliquefaciens* en el suelo. La inoculación de las plantas con *Pc* fue a los 30 días desde la inoculación previa con sílice y las dos cepas de *B. amyloliquefaciens*. A los 30 días las cepas de *B. amyloliquefaciens* no tendrían el mismo efecto antifúngico e inhibidor ante *Pc*. Vimos en el ensayo 5 (Figura 10) que la cepa ISB05 inoculada en el suelo era activa inhibiendo la formación de esporangios de *Pc* hasta el día 15 aproximadamente, perdiendo progresivamente su capacidad fungicida con el tiempo. En todo caso, en una dehesa no resultaría sostenible hacer tratamientos permanentemente, y lo ideal sería que la población del agente de biocontrol se mantuviera estable en el tiempo.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

I. SiO_2 no reduce significativamente el crecimiento miceliar de *Pc*. Sí lo hace *Bacillus amyloliquefaciens*, especialmente la cepa ISB05 tanto en contacto directo como los volátiles emitidos.

II. Hojas de *Q. suber* pulverizadas con *B. amyloliquefaciens* y concentraciones de 0,5 y 1 g/L de SiO_2 muestran menor pudrición ante *Pc* que hojas no tratadas.

III. Suelo tratado con *B. amyloliquefaciens* ISB05 es supresivo a la formación de esporangios de *Pc*, con un efecto que dura sólo 15 días.

IV. SiO_2 y *B. amyloliquefaciens* incrementan la altura del castaño y del alcornoque de una savia al final del período vegetativo.

V. Con las dosis utilizadas, ni el sílice ni *B. amyloliquefaciens* reducen significativamente la mortalidad de castaños, encinas y alcornoques ante *Pc*.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, S.T., Islam, M., Mun, H.S., Sim, H.J., Kim, Y.J., Yang, C.J., 2014. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. Poultry Science 93, 1–9.

Araújo, M.U.P., Rios, J.K., Silva, E.T., Rodrigues, F.A. 2019. Silicon alleviates the changes in the source-sink relationship of wheat plant infected by Pyricularia oryzae. Phytopalogy, 109 1-39.

Bailey-Serres, J., Colmer, T.D., 2014. Plant tolerance of flooding stress– recent advances. Plant Cell and Enviroment 37, 2211–2215.

Balci, Y., Halmschlager, E., 2003. *Phytophthora* species in oak ecosystems in Turkey and their association with declining oak trees. Plant Pathology 52, 694–702.

Bathoova, M., Bokorab, B., Soukupac, M., Luxac, A., Martinkaa, M., 2018. Silicon mediated cell wall modifications of sorghum root exodermis and suppression of invasión by fungus *Alternaria alternata*. Plant Pathology 67, 1891–1900.

Broadbent, P., Baker, K.F., 1974. Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* in soils suppressive and conducive to root rot. Australian Journal of Agricultural Research 25, 121–137.

Carneiro-Carvalho, A., Pereira, C., Marques, T., Martins, L., Anjos, R., Pinto, T., Lousada, J., Gomes-Laranjo, J., 2017. Potential of silicon fertilization in the resistance of chestnut plants to ink disease (*Phytophthora cinnamomi*). Internacional Journal of Enviroment, Agriculture and Biotechnology 2, 2740-2753.

Ceballos y Fernández de Córdoba, L., Ruiz de la Torre, J., 1971. Árboles y Arbustos de la España Peninsular. ETSI Montes, Madrid. ISBN 978-84-600-1541-3.

Chakraborty, U., Bishwanath Chakraborty, B., Basnet, M., 2006. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. Journal of basic microbiology 46, 186-195.

Corcobado-Sánchez, T., 2013. Influencia de" *Phytophthora cinnamomi*" Rands en el decaimento de" *Quercus ilex* L." y su relación con las propiedades del suelo y las ectomicorrizas.

Corredoira, E., Valladares, S., Allona, I., Aragoncillo, C., Vieitez, A.M., Ballester, A., 2012. Genetic transformation of European chestnut somatic embryos with a native thaumatin-lie protein (CsTL1) gene isolated from *Castanea sativa* seeds. Tree Physiology 1–14.

Datnoff, L.E., Seebold, K.W., Correa, F.J.V., 2001. The use of silicon for integrated disease management: reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. Studies in Plant Science 8, 171–184.

Downer, A., Menge, J., Pond, E., 2001. Effects of cellulytic enzymes on *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 91, 839-846.

Epstein E. 1999. Silicon. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50, 641–664.

Gómez-Aparicio, L., Ibáñez, B., Serrano, M.S., De Vita, P., Ávila, J.M., Pérez-Ramos, I.M., García, L.V., Esperanza Sánchez, M., Marañón, T., 2012. Spatial patterns of soil pathogens in declining Mediterranean forests: implications for tree species regeneration New Phytologist 194, 1014-1024.

Helfer, S., 2013. Rust fungi and global change. New Phytologist 201, 770–780.

Horta, M., Caetano, P., Medeira, C., Maia, I., & Cravador, A., 2010. Involvement of the β-cinnamomin elicitin in infection and colonisation of cork oak roots by *Phytophthora cinnamomi*. European Journal of Plant Pathology 127, 427-436.

Jung, T., Blaschke, H., Neumann, P., 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. European Journal Forest Pathology 26, 253–272.

Jung, T., Orlikowski, L., Henricot, B., Abad-Campos, P., Aday, A.G., Aguín Casal, O., Bakonyi, J., Cacciola, S.O., Cech, T., Chavarriaga, D., Corcobado, T., Cravador, A., Decourcelle, T., Denton, G., Diamandis, S., Dogmus-Lehtijärvi, H.T., Franceschini, A., Ginetti, B., Green, S., Glavendeki´c, M., Hantula, J., Hartmann, G., Herrero, M., Ivic, D., Horta Jung, M., Lilja, A., Keca, N., Kramarets, V., Lyubenova, A., Machado, H., Magnano di San Lio, G., Mansilla Vázquez, P.J., Marçais, B., Matsiakh, I., Milenkovic, I., Moricca, S., Nagy, Z.Á., Nechwatal, J., Olsson, C., Oszako, T., Pane, A., Paplomatas E.J., Pintos Varela, C., Prospero, S., Rial Martínez, C., Rigling, D., Robin, C., Rytkönen, A., Sánchez, M.E., Sanz Ros, A.V., Scanu, B., Schlenzig, A., Schumacher, J., Slavov, S., Solla, A., Sousa, E., Stenlid, J., Talgø, V., Tomic, Z., Tsopelas, P., Vannini, A., Vettraino, A.M., Wenneker, M., Woodward, S., Peréz-Sierra A., 2016. Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. Forest Pathology 46, 134-163.

Kumar, A.S., Lakshmanan, V., Caplan, J.L., Powell, D., Czymmek, K.J., Levia, D.F., 2012. Rhizobacteria *Bacillus subtilis* restricts foliar pathogen entry through stomata. The Plant Journal 72, 694–706.

Lee, B.D., Dutta, S., Ryu, H., Yoo, S-J., Suh, D.S., Park. K, 2015. Induction of systemic resistance in *Panax ginseng* against *Phytophthora cactorum* by native *Bacillus amyloliquefaciens* HK34. Journal of Ginseng research 39 213-220.

Martín-García, J., Solla, A., Corcobado, T., Siasou, E., Woodward, S., 2014. Influence of temperature on germination of *Quercus ilex* in *Phytophthora cinnamomi*, *P. gonapodyides*, *P. quercina* and *P. psychrophila* infested soils. Forest Pathology 45, 215-223.

Montero, G., 2018. *Castanea sativa* Mill. El castaño 72, 6-7.

Nagórska, K., Bikowski, M., Obuchowski, M., 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. Acta Biochimica Polonica-English Edition 54, 495–508.

Pautasso, M., Döring, T.F., Garbelotto, M., Pellis, L., Leger, M.J., 2012. Impacts of climate change on plant diseases – opinions and trends. European Journal Plant Pathology 133, 295–313.

Pulido, F., Picardo, A., 2010. El libro verde de la dehesa. Consejería de Medio Ambiente (Junta de Castilla y León), Sociedad Española de Ciencias Forestales (SECF), Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP), Asociación Española de Ecología Terrestre (AEET) y Sociedad Española de Ornitología (SED).

Ruiz-Gómez, F.J., Sánchez-Cuesta, R., Navarro-Cerrillo, R.M., Pérez-de-Luque, A., 2012. A method to quantify infection and colonization of holm oak (*Quercus ilex*) roots by *Phytophthora cinnamomi*. Plant methods 8, 39.

Santini, A., Ghelardini, L., De Pace, C., Desprez-Loustau, M.L., Capretti, P., Chandelier,A., Cech, T., Chira, D., Diamandis, S., Gaitniekis, T., Hantula, J., Holdenrieder, O., Jankovsky, L., Jung, T., Jurc, D., Kirisits, T., Kunca, A., Lygis, V., Malecka, M., Mar-cais, B., Schmitz, S., Schumacher, J., Solheim, H., Solla, A., Szabò, I., Tsopelas, P.,Vannini, A., Vettraino, A.M., Webber, J., Woodward, S., Stenlid, J., 2013. Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. New Phytologist 197, 238-250.

Serrano, L., Galindo, E., 2007. “Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario”, Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias 58, 77-88.

Serrano, M.S., Fernández-Rebollo, P., De Vita, P., Sánchez, M.E., 2012. Susceptibility of common herbaceous crops to *Phytophthora cinnamomi* and its influence on *Quercus* root rot in rangelands. European Journal of Plant Pathology 134, 409-414.

Shearer, B.L, Crane, C.E., 2011. Habitat suitability of soils from a topographic gradient across the Fitzgerald River National Park for invasion by *Phytophthora cinnamomi*. Australas Plant Pathology 40,168–179.

Siahmoshteh, F., Hamidi-Esfahani, Z., Razzaghi-Abyaneh, M., 2016. Antifungal activity, biodegradation and production inhibition of aflatoxins B1 and G1 by a soil isolate of *Bacillus subtilis* against *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. Journal of Pure and Applied Microbiology 10, 2541–2549.

Siahmoshteh, F., Siciliano, I., Banani, H., Hamidi-Esfahani, Z., Razzaghi-Abyaneh, M., Gullino, M.L., Spadaro, D., 2017. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* in the control of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxins production on pistachio. International journal of food microbiology 254, 47-53.

Solla, A., Aguín, O., Cubera, E., Sampedro, L., Mansilla, J.P. and Zas, R. 2011. Survival time analysis of *Pinus pinaster* inoculated with *Armillaria ostoyae*: genetic variation and relevance of seed and root traits. European Journal of Plant Pathology 130, 477–488.

Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Tignor, M.B., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M., 2013. Technical summary. in: Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report on the Intergovernmental Panel on Climate Change. Ed. Stocker et al NY, Cambridge University Press.

Sturrock, R.N., Frankel, S.J., Brown, A.V., Hennon, P.E., Kliejunas, J.T., K. J.Lewis, K.J., Worrall, J.J., Woods, A.J., 2011. Climate change and forest diseases. Plant Pathology 60, 133–149.

Tubaña, B.S., Heckman, J.R., 2015. Silicon in Soils and Plants. In: Rodrigues, F., Datnoff, L., (eds) Silicon and Plant Diseases. Springer, Cham.

Vannini, A., Vettraino, A.M., 2001. Ink disease in chestnuts: impact on the European chestnut. Forest Snow and Landscape Research. 76, 345–350.

Vettraino, A., Morel, O., Perlerou, C., Robin, C., Diamandis, S., Vannini, A., 2005. Occurrence and distribution of *Phytophthora* species in European chestnut stands, and 43 their association with Ink Disease and crow decline. European Journal of Plant Pathology 111, 169-180.

Vitullo, D., Di Pietro, A., Romano, A., Lanzotti, V., Lima, G., 2012. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. Plant Pathology 61, 689–699.

Yáñez-López, R., Torres-Pachecho, I., Guevara-González, R.G., Hernández-Zul, M.I., Quijano-Carranza, J.A., Rico-García, E., 2012. The effect of climate change on plant diseases. African Journal of Biotechnology 11, 2417–2428.

Zhao, Y., Zhang, W., Xu, W., Mai, K., Zhang, Y., Liufu, Z., 2012. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against Vibrio splendidus infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish & Shellfish Immunology 32, 750–755.

ANEJO I: FOTOGRAFÍAS

ANEJO I: FOTOGRAFÍAS

Ensayo 1. Diseño para evaluar crecimiento miceliar de *Pc* en medio V_8 con SiO_2 en placas de Petri.

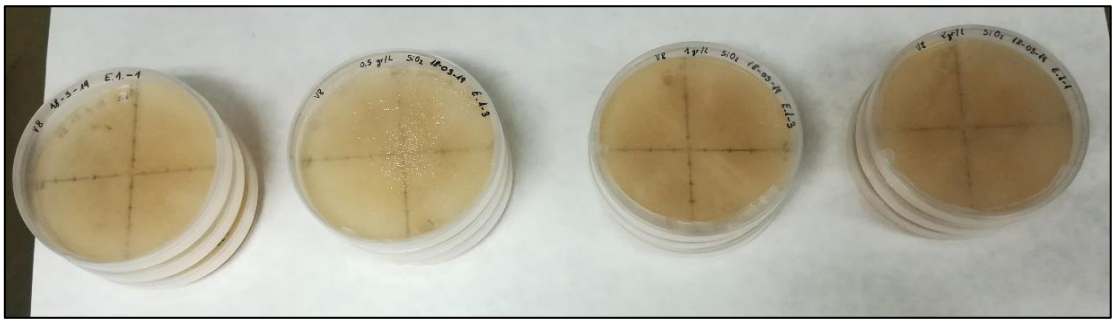


Figura I. 1. Placas con medio V_8, *Pc* y diferentes concentraciones de SiO_2.

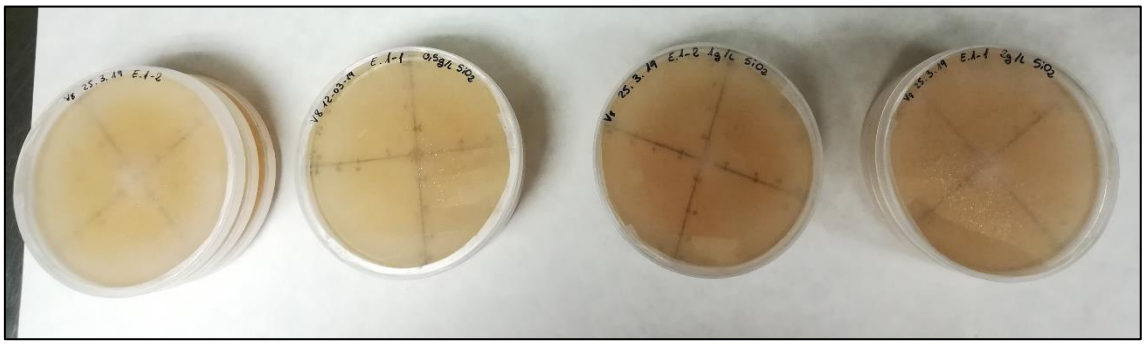
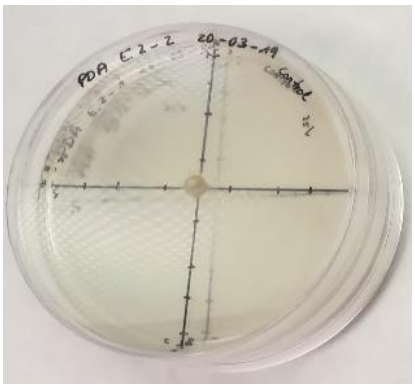


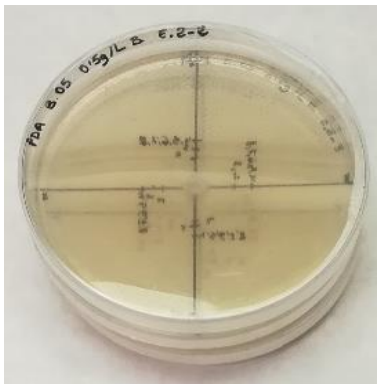
Figura I. 2. Placas con medio V_8, *Pc* repicada y diferentes concentraciones de SiO_2.

Ensayo 2. Diseño para evaluar crecimiento miceliar de *Pc* en medio con diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* en placas de Petri.

Figura I. 3. Preparación del medio PDA.



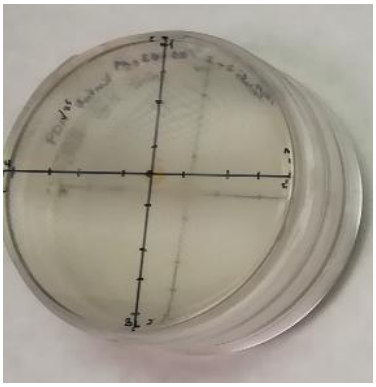
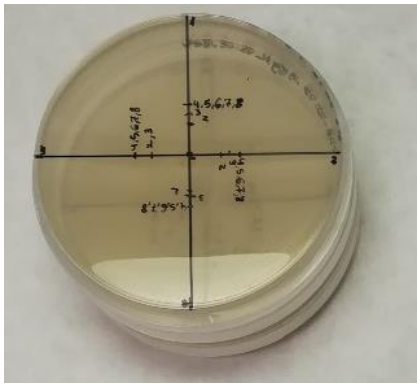
a)



b)

c)

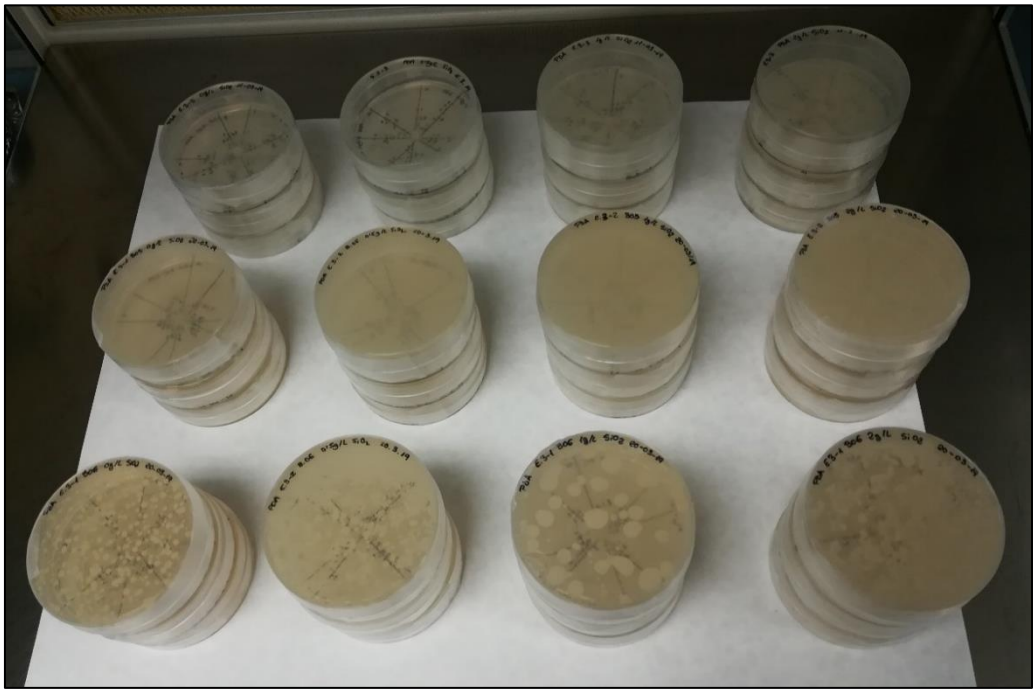
Figura I. 4. Parte delantera de placas con medio PDA, *Pc* y diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*. **a)** Placa Control (Sin *B. amyloliquefaciens*); **b)** Placas con *B. amyloliquefaciens* ISB05; **c)** Placas con *B. amyloliquefaciens* ISB06.


a)

b)

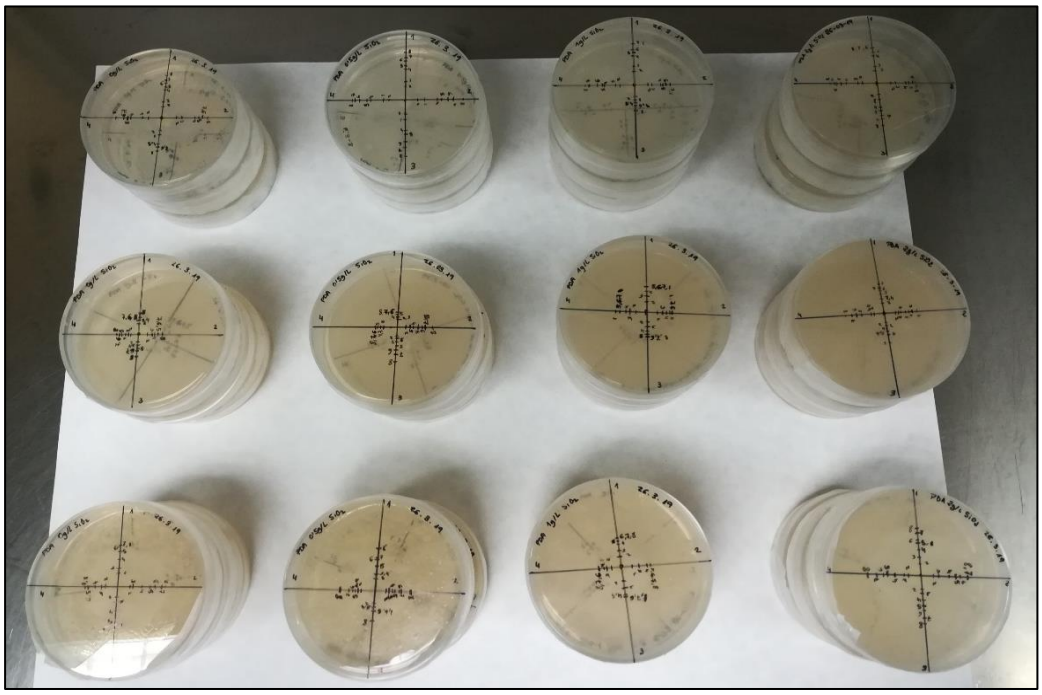
c)

Figura I. 5. Parte trasera de placas con medio PDA, *Pc* y diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*. **a)** Placa Control (Sin *B. amyloliquefaciens*); **b)** Placas con *B. amyloliquefaciens* ISB05; **c)** Placas con *B. amyloliquefaciens* ISB06.

Ensayo 3. Diseño para evaluar crecimiento miceliar de *Pc* en medio con SiO_2, en placas de Petri montadas sobre otras placas con *B. amyloliquefaciens.*



a)



b)

Figura I. 6. Conjunto de tratamientos para evaluación de volátiles producidos por *B. amyloliquefaciens*. a) Base inferior con *B. amyloliquefaciens* y diferentes concentraciones de SiO_2: b) Base superior con *Pc* y diferentes concentraciones de SiO_2.

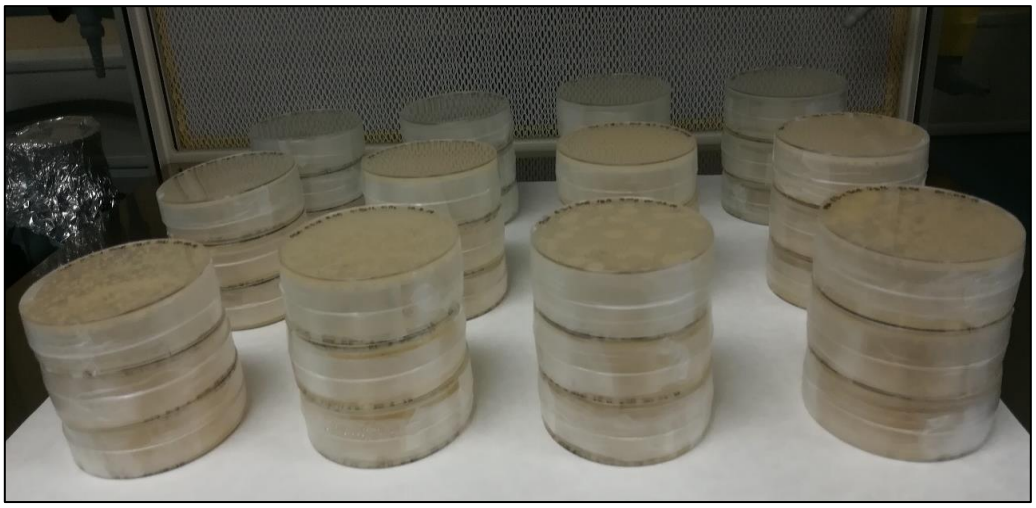


Figura I. 7. Placas enfrentadas para evaluar volátiles producidos por *B. amyloliquefaciens*.

Ensayo 4. Diseño para evaluar el número de lesiones de *Pc* en hoja tras la pulverización individual y combinada de SiO_2 y *B. amyloliquefaciens*.

Figura I. 8. Preparación de los tratamientos para pulverización de hojas de alcornoque.

Figura I. 9. Pulverización de tratamientos en ramas de alcornoque.

Figura I. 10. “Plugs” de *Pc* para suspensión de zoosporas.

Figura I. 11. Hojas sumergidas en suspensión de zoosporas.

a)

b)

c)

Figura I. 12. Secado y evaluación de hojas afectadas. **a)** Réplica 1; **b)** Réplica 2: **c)** Réplica 3.

Ensayo 5. Evaluación de la formación de esporangios en “plugs” de *Pc* dentro de placas de Petri.

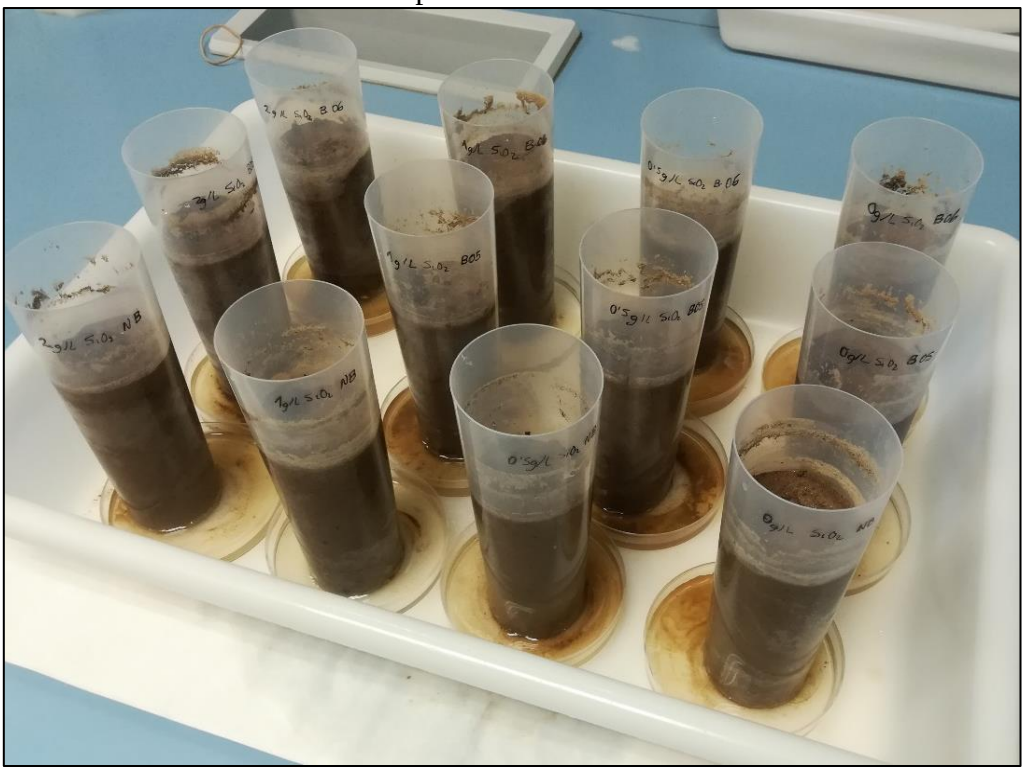


Figura I. 13. Vasos hidratados con suelo adehesado y diferentes tratamientos de *B. amyloliquefaciens* y SiO_2.

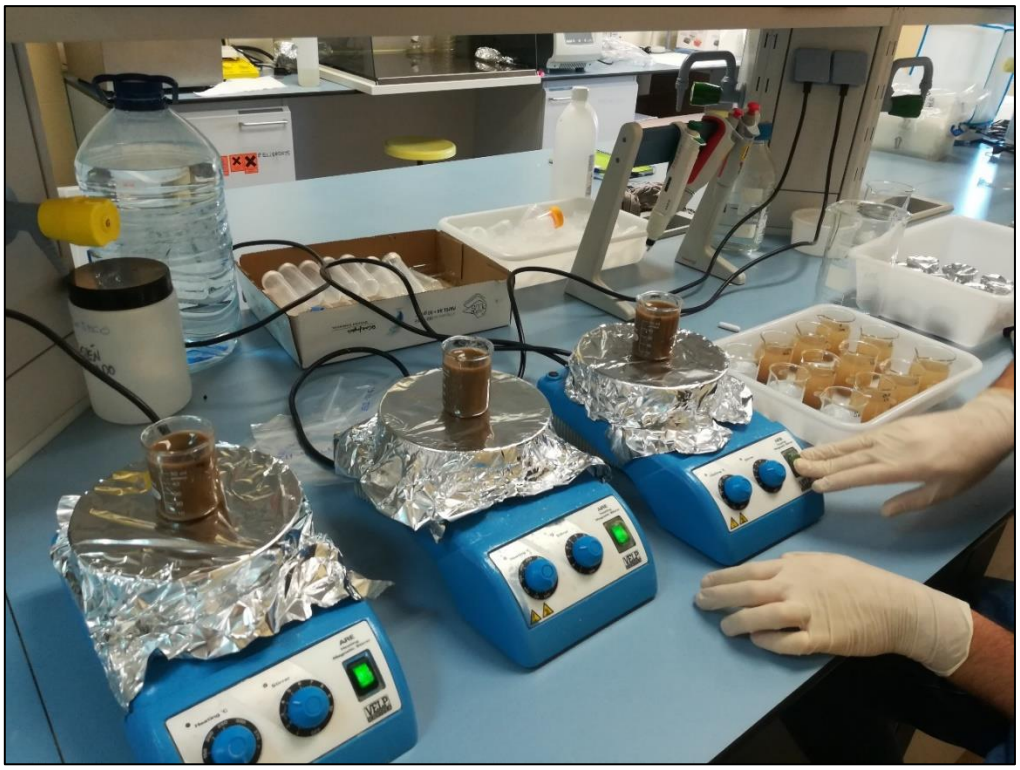


Figura I. 14. Preparación de la solución de suelo.

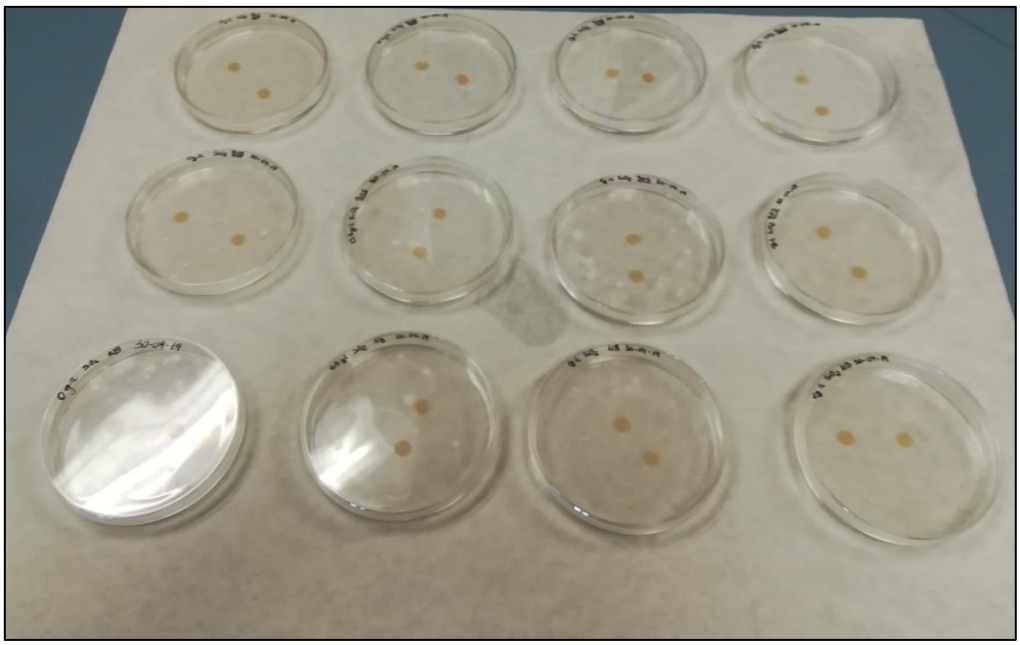


Figura I. 15. Placas con dos "plugs" de *Pc*.

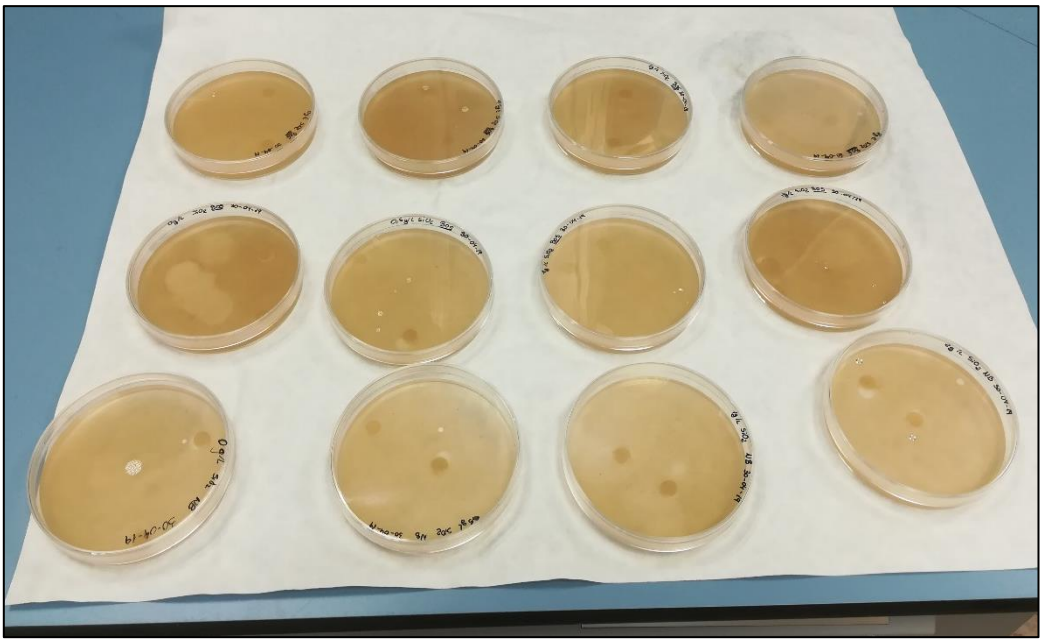


Figura I. 16. Placas con solución de suelo y dos “plugs” de *Pc.*

Ensayo 6. Evaluación si SiO_2 + *B. amyloliquefaciens* incrementa el vigor de *C. sativa*, *Q. ilex* y *Q. suber* y reduce la mortalidad ante *Pc.*

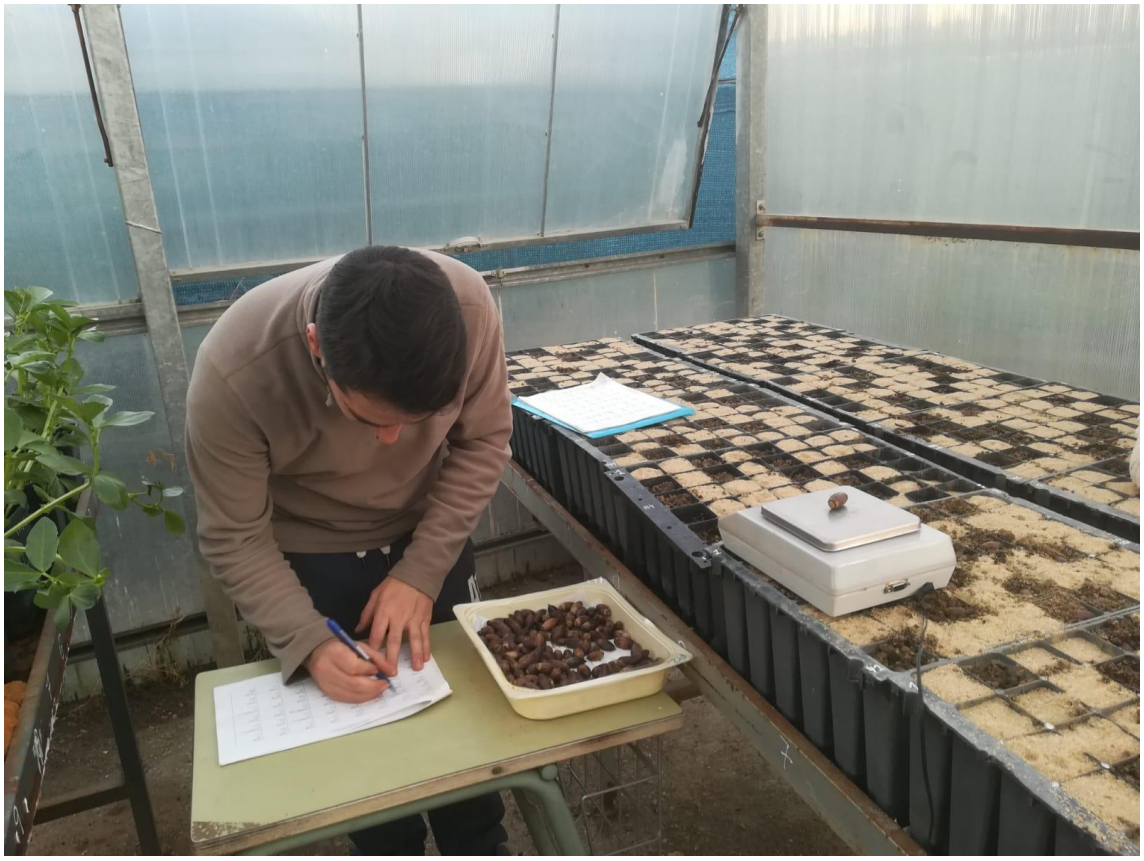


Figura I. 17. Medidas del peso, longitud y radícula de las semillas.

Figura I. 18. Bandejas preparadas para germinación.

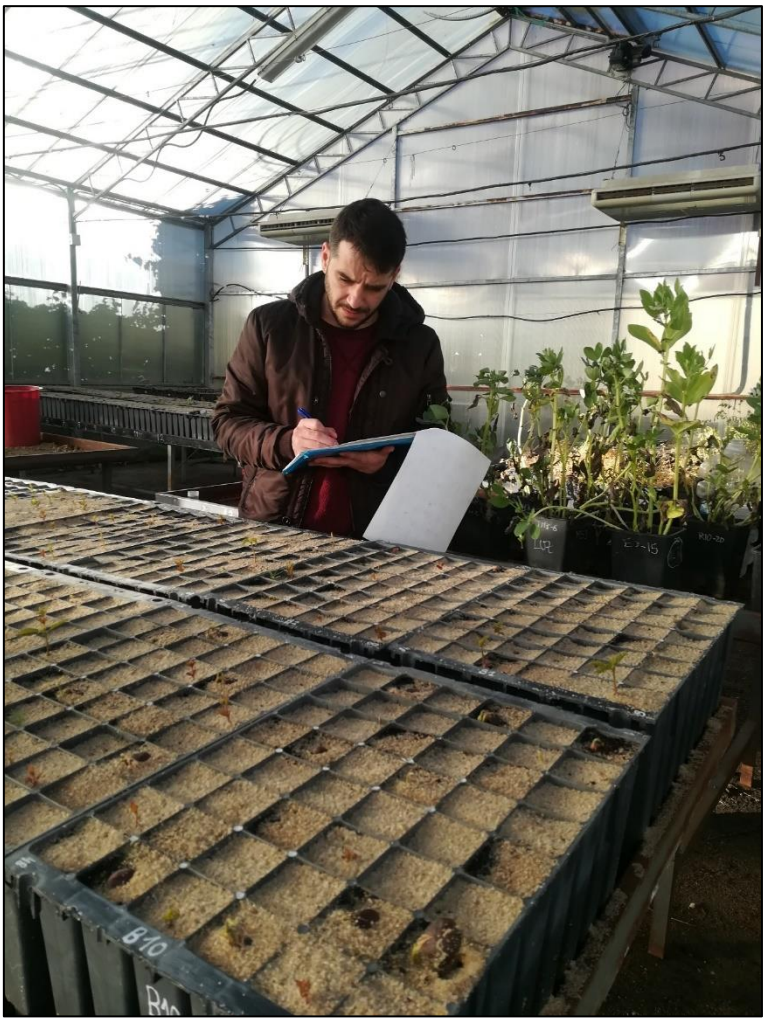


Figura I. 19. Anotación de la emergencia.

Figura I. 20. Diseño de las plantas antes de los tratamientos.

Figura I. 21. Inoculación con *B. amyloliquefaciens* y SiO_2.

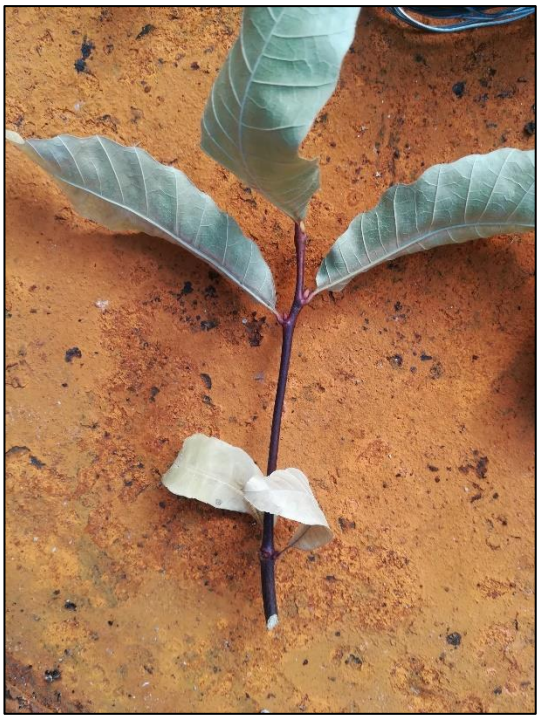
Figura I. 22. Matraz Erlenmeyer de *Pc*.

Figura I. 23. Medición antes de inocular con *Pc*.

Figura I. 24. Inoculación de *Pc*.

Figura I. 25. Inundación para esporulación de esporangios de *Pc*.

Figura I. 26. Todas las bandejas preparadas para la evaluación semanal de la mortalidad.



a)

b)

Figura I. 27. Efectos de *Pc*. **a)** Tallo necrosado; **b)** Pudrición radicular.

Figura I. 28. Plantas sin inocular con *Pc*, observadas el último día del ensayo.

Figura I. 29. Plantas inoculadas con *Pc*, observadas el último día del ensayo.