



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

***NUEVAS TECNOLOGÍAS DE
MEJORA DE CULTIVOS
VEGETALES: USO DE ALGAS Y
COMPUESTOS DERIVADOS
NEW TECHNOLOGIES FOR CROP
IMPROVEMENT: USE OF ALGAE AND
ALGAE-DERIVED COMPOUNDS***

Autor: Javier López Garrido

Tutor: Hugo Mélida Martínez

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2023

ÍNDICE

| | |
|---|-------------------------------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1.Importancia de la agricultura y amenazas | 1 |
| 1.2 Posibles soluciones frente a las amenazas | 2 |
| 2. OBJETIVOS..... | 4 |
| 3. METODOLOGÍA..... | 4 |
| 4. ALGAS | 5 |
| 4.1.Tipos de Algas | 5 |
| 4.1.1 Macroalgas | Error! Bookmark not defined. |
| 4.1.2 Microalgas..... | Error! Bookmark not defined. |
| 4.2. Aplicaciones de algas en agricultura..... | 9 |
| 4.2.1. Estimulación del Crecimiento Vegetal (Biofertilizantes) | 9 |
| 4.2.2. Protección frente a enfermedades y plagas | 11 |
| 4.3. Edición genómica de algas para mejora de cultivos | 17 |
| 4.3.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 18 |
| 4.3.2 Expresión del gen de la quitina sintetasa en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 18 |
| 5. CONCLUSIONES | 21 |
| 6. REFERENCIAS | 23 |

RESUMEN

La finalidad de este Trabajo de Fin de Grado ha sido realizar una revisión bibliográfica sobre las aplicaciones de algas sobre cultivos con el objetivo de mejorar las técnicas agrícolas y fomentar una agricultura más sostenible. Se han logrado grandes resultados en investigaciones mediante el uso de extractos de algas con diferentes propiedades, por ejemplo, su uso como biofertilizantes para estimular el crecimiento vegetal. También se han conseguido buenos resultados para su uso frente a la protección de plagas y enfermedades, debido a su actividad herbicida, antiviral, antibacteriana, nematocida o antifúngica. Finalmente, se propone una técnica innovadora sobre edición genómica que pretende introducir el gen de la quitina sintetasa en el microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, con el objetivo de que pueda sintetizar quitina en su pared celular y contribuya a la protección de plantas debido a su actividad inmunoestimulante.

ABSTRACT

The purpose of this Final Degree Project has been to carry out a literature review on the applications of algae in crops with the aim of improving agricultural techniques and promoting more sustainable agriculture. Significant results have been achieved in research through the use of algae extracts with interesting properties, such as their use as biofertilizers to stimulate plant growth. Promising results have also been achieved for their use in pest and disease plant protection, due to their herbicidal, antiviral, antibacterial, nematocidal, or antifungal activity. Finally, an innovative technique is proposed for genome editing, aiming to introduce the chitin synthase gene into the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, so that it can synthesize chitin in its cell wall and contribute to plant protection through its immunostimulant activity.

Palabras clave: Agricultura, Macroalgas, Microalgas, Edición genética, *Chlamydomonas reinhardtii*.

Keywords: Agriculture, Macroalgae, Microalgae, Genetic modification, *Chlamydomonas reinhardtii*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de la agricultura y amenazas

La agricultura es indispensable para el sustento humano, proporcionando además de alimentos, fibras textiles, combustibles e incluso fármacos. La agricultura es la base de la economía de numerosos países, llegando a representar hasta el 25 % del PIB (producto interior bruto) para los países en desarrollo. Por tanto, el desarrollo agrícola constituye uno de los medios más importantes para poner fin a la pobreza extrema, impulsar la prosperidad compartida y alimentar a la población. Sin embargo, existen numerosas amenazas que podrían limitar la producción agraria en la actualidad y en el futuro (Banco Mundial, 2023).

El primer problema, es el crecimiento poblacional, proyectado en unos 9.700 millones de habitantes para 2050 (actualmente 7.900 millones) (Naciones Unidas, 2023). Según esta estimación, se necesitarán entre 2.000 y 3.000 millones de toneladas de cereales adicionales, lo que supondría un aumento del 50 % en la producción anual. Estos datos indican una preocupante tendencia hacia el aumento del hambre a nivel mundial, con aproximadamente 653 millones de personas sufriendo de desnutrición en la actualidad (Raman, 2017). Con el objetivo de aumentar la producción se podrían usar diferentes alternativas: nuevas técnicas innovadoras en agricultura, bioeconomías circulares a través de agrotecnologías, agricultura de precisión y nanopartículas para una agricultura sostenible y climáticamente favorable. Pese a todo ello, es muy complicado que las prácticas agrícolas por sí solas consigan erradicar este problema (Mahapatra *et al.*, 2022).

El siguiente problema, son las plagas y enfermedades, que provocan pérdidas anuales de entre el 10 y 28 % del total de cultivos (Fao, 2023). Esto no solo provoca pérdidas económicas, sino que también reduce la producción y aumenta la necesidad del uso de productos químicos y fertilizantes que dañan los suelos y contaminan las fuentes de agua. Estas mayores incidencias se han atribuido en gran medida a la globalización, que conduce a un mayor movimiento de plantas y sus plagas, un aumento de los vectores de enfermedades, el cambio climático y el calentamiento global. Si bien las técnicas integradas de manejo y prevención de plagas mitigan un poco el problema, son insuficientes para abordar las enfermedades transfronterizas de cultivos. (Raman, 2017).

En adelante, se plantea otro desafío relacionado con la presión sobre los recursos naturales, ya que se estima que para el año 2050 habrá una escasez de recursos disponibles para el manejo y cuidado de cultivos (Fao, 2009). A pesar de la eficiencia agrícola, las técnicas insostenibles

se han intensificado debido a la urbanización, el crecimiento demográfico, la industrialización y el cambio climático. La deforestación con fines agrícolas ha impulsado el 80 % de la deforestación en todo el mundo. Además, las extracciones de agua para la agricultura representaron el 70 % en países de África del Norte y Asia Central, generando así otros problemas como la escasez de agua para esas poblaciones (Raman, 2017)

Finalmente, los sistemas agrícolas actuales también amenazan la salud de las personas y del planeta, ya que generan altos niveles de contaminación y desechos. Se estima que hasta un tercio de los alimentos producidos en el mundo se pierde o se desperdicia. Por ejemplo, el excesivo uso de agroquímicos durante las últimas décadas, principalmente plaguicidas, resulta una amenaza para la salud humana y ha conllevado al deterioro de las propiedades biológicas y fisicoquímicas del suelo y los sistemas ecológicos asociados (Gupta *et al.*, 2022).

En vista de lo anterior, existe una necesidad urgente de investigar sobre nuevas prácticas agrícolas con el objetivo de poder evitar todos los problemas mencionados anteriormente.

1.2 Posibles soluciones frente a las amenazas para la agricultura

Uno de los principales avances que surge con el objetivo de paliar los problemas actuales es la mejora genética de cultivos. En un principio, se seleccionaban aquellos ejemplares que presentaban las mejores características, pero, el descubrimiento de La Ley de Herencia de Mendel impulsó la mejora tradicional. Desde ese momento, se empiezan a usar técnicas de cruzamiento con el fin de combinar las características deseables de diferentes cultivos. A parte, también se comenzó a realizar mutagénesis inducida con el fin de obtener mayor variabilidad genética en la mejora de cultivos (Zhang *et al.*, 2021). Sin embargo, las técnicas de mejora convencionales tienen sus desventajas, tales como mutaciones genéticas incontroladas, la necesidad de que las plantas parentales estén estrechamente relacionadas para producir descendencia y el laborioso procedimiento (Hamdan *et al.*, 2022).

El avance de la tecnología transgénica para la producción de organismos modificados genéticamente ha permitido introducir genes exógenos y mejorar rasgos específicos en las plantas. Esto ha sido beneficioso tanto para la economía como para el medio ambiente, y es que, el rendimiento mundial de cultivos alimentarios ha aumentado en más 370 millones de toneladas (Raman, 2017). Además, se ha registrado que los cultivos transgénicos reducen los impactos ambientales y ecológicos, lo que lleva a aumentos en la diversidad de especies. Sin embargo, los avances en los cultivos transgénicos han planteado preguntas importantes sobre su seguridad y eficacia, por lo que, hoy en día, están sujetos a numerosas regulaciones para

controlar problemas relacionados con la salud humana y la resistencia de los insectos que puedan derivar del consumo de cultivos transgénicos (Raman, 2017).

También cabe destacar la nanotecnología, una estrategia alternativa a la mejora vegetal que proporciona herramientas ecológicas, eficientes e innovadoras para mejorar la producción y la seguridad alimentaria, ayudando a mitigar el impacto negativo de la aplicación de agroquímicos. Los nanomateriales se definen como “material que contiene partículas en un estado no unido, aglomerado o agregado, donde el 50 % o más de las partículas están en el rango de 1–100 nm” (EUON, 2022). La nanotecnología se considera un campo prometedor para promover el crecimiento y la nutrición de las plantas a través de la entrega de fertilizantes o compuestos activos en sitios específicos. Además, existen técnicas de nanoencapsulación que permiten la liberación prolongada y sostenida de nutrientes o inductores del crecimiento, lo que permite una mejor penetración y absorción de nutrientes por parte de las raíces de las plantas (Fincheira *et al.*, 2021). Principalmente, los beneficios del uso de nanofertilizantes son la reducción de la lixiviación y volatilización, así como, el impacto positivo en el rendimiento y la calidad del producto que promete aumentar el margen de ganancias de los productores a través de la utilización de esta tecnología. Sin embargo, es necesario analizar la interacción nanomateriales-planta-suelo, la toxicidad potencial de los nanomateriales para determinar su impacto en alimentos y el medio ambiente y los efectos potenciales sobre la salud humana antes de su comercialización (Zulfiqar *et al.*, 2019).

Como bien se mencionó anteriormente, el aumento de la población mundial conduce a una mayor presión demográfica y, por tanto, también impulsa una mayor explotación de los recursos acuáticos. Las floraciones de algas son, en general, eventos naturales que benefician a las poblaciones de organismos más grandes que viven en los medios acuáticos. Sin embargo, la explosión de las poblaciones de algas debido al aumento de nutrientes que llegan a los ecosistemas acuáticos derivados de los desechos de la actividad humana causa condiciones hipóxicas bajo las cuales solo unas pocas criaturas pueden prosperar. Por otra parte, las algas contienen polímeros y compuestos biológicamente activos que desempeñan un papel importante en la defensa de las plantas y ofrecen un potencial prometedor en la agricultura. En respuesta a esto, se están llevando a cabo investigaciones para evaluar la capacidad extractos procedentes de micro y macroalgas de mejorar el crecimiento de las plantas, permitiendo convertir un problema en una solución (Roy *et al.*, 2022).. Estos extractos se aplican en sobre las plantas o en el suelo como fertilizante. Estudios recientes han demostrado

mejoras en la producción de frutos, la germinación de semillas, el desarrollo de raíces, la calidad de las hojas, el vigor de la planta y la resistencia a patógenos (Roy *et al.*, 2022).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es realizar una revisión bibliográfica sobre el emergente papel de las algas en la mejora de cultivos. A su vez, se propone una nueva perspectiva sobre la edición genética en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* y su posible aplicación en la defensa de cultivos.

Por tanto, el objetivo principal se desglosa en dos objetivos:

- 1- Recopilación de información sobre el uso de algas en la agricultura y sus aplicaciones beneficiosas sobre cultivos.
- 2- Propuesta de edición genética, al introducir el gen de quitina sintetasa en *Chlamydomonas reinhardtii* debido a sus características inmunoestimulantes.

3. METODOLOGÍA

Para abordar los objetivos se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica analizando artículos científicos publicados en revistas, así como otros recursos como trabajos de fin de grado o tesis doctorales.

Para comenzar se ha realizado una búsqueda mediante el uso de bases de datos electrónicas como son *Pubmed*, *Google Scholar* o *Scopus*. Para ello se han utilizado palabras clave como “microalgae”, “macroalgae”, “crop improvement”, “plants” y “genome editing”. Además, se ha recurrido al uso de los operadores booleanos “AND”, “OR” y “NOT” para realizar las distintas combinaciones de búsqueda de información.

Además, se ha introducido un filtro para obtener solo artículos publicados en los últimos 10 años, y en el caso, de que hubiese un amplio número de publicaciones se redujo la búsqueda a publicaciones de los últimos 5 años. Gracias a esta búsqueda se han seleccionado aquellos artículos de acceso libre a texto completo desde la Universidad de León y se ha prescindido de aquellos que desarrollarán aspectos que no entraban en el marco de estudio de este Trabajo Fin de Grado.

A continuación, gracias a estos artículos obtenidos, se ha ampliado la búsqueda obteniendo artículos relacionados usando las citas de los propios artículos u obtener aquellas publicaciones en los que nuestro artículo de interés este en sus referencias gracias al buscador

Google Scholar. El flujo de trabajo utilizado para la selección de artículos científicos se resume en la Figura 1, en la que se distinguen las 4 fases aplicadas: identificación, cribado, idoneidad e inclusión. Este flujo permitió seleccionar 54 artículos a partir de los 156 inicialmente considerados.

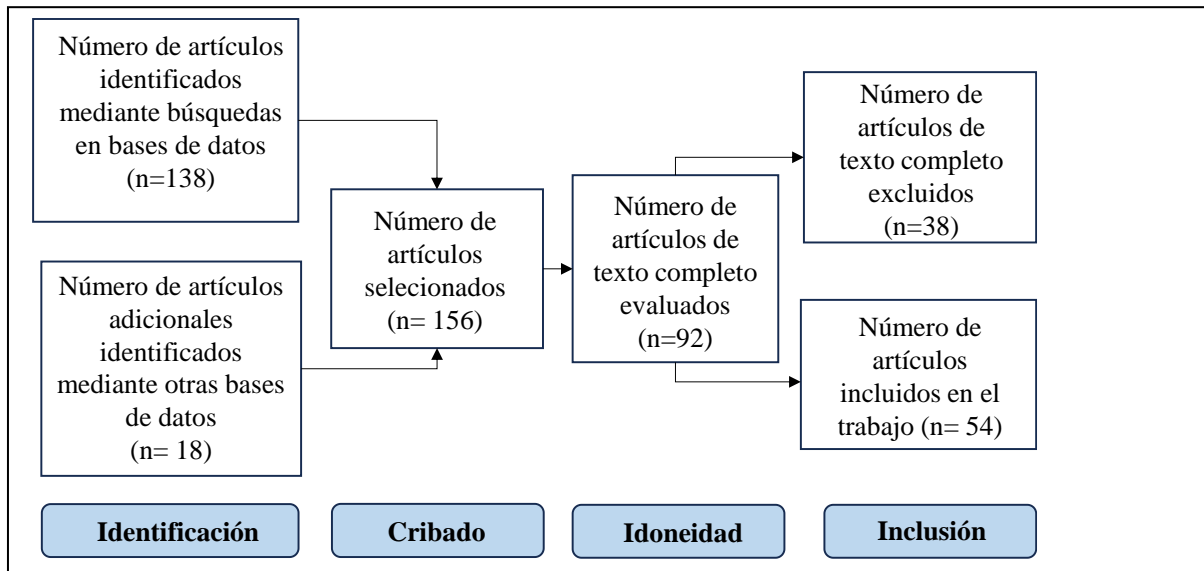


Figura 1: Diagrama de flujo de la metodología usada para la selección de fuentes bibliográficas usadas en el presente Trabajo Fin de Grado.

4. ALGAS

4.1. Tipos de Algas

Las algas son grupos de organismos fotosintéticos procariontes o eucariotes que se encuentran ubicuamente en una amplia gama de hábitats, desde el suelo hasta el agua. Son organismos talófitos, en los que el cuerpo no está organizado en verdaderos tallos, hojas y raíces (Roy *et al.*, 2022). Sus cuerpos vegetativos primitivos carecen de sistema vascular, lo que los hace dependientes del agua todo el tiempo, sin embargo, se pueden encontrar en condiciones frías a cálidas y de alcalinas a ácidas. Las algas, a su vez, pueden ser solitarias o vivir en colonias. (Roy *et al.*, 2022). Actualmente en la base de datos AlgaBase se recoge que existen 171.302 especies diferentes de algas entre macro y microalgas (AlgaBase, 2023).

Las algas están siendo investigadas por sus aspectos beneficiosos tanto para los seres humanos como para el medio ambiente. Las algas pueden desempeñar un papel importante en el monitoreo de la contaminación del agua y en la predicción de sus consecuencias futuras. Estas pueden llevar a cabo procesos de biorremediación para eliminar los contaminantes presentes en el agua. También se están utilizando en el campo de la energía sostenible, por

ejemplo, los biocombustibles como el biodiesel y el bioetanol se han producido con éxito a partir de algas. Otras aplicaciones son la producción de electricidad a través de la digestión anaerobia que presentan las algas. La biomasa de algas también posee diversos compuestos bioactivos que pueden ayudar a facilitar la producción de productos de valor añadido para la industria alimentaria y farmacéutica (Roy *et al.*, 2022).

La contribución de las algas en la agricultura es incalculable, ya que pueden actuar como promotores biológicos del crecimiento de los cultivos. Específicamente, las microalgas promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas, mejoran el contenido de carbono orgánico del suelo, producen hormonas de crecimiento y previenen enfermedades de las plantas (Roy *et al.*, 2022). Por ejemplo, la biorremediación con el uso de microalgas ha adquirido mucha importancia en la agricultura, con el objetivo de eliminar contaminantes del suelo y favorecer el crecimiento de plantas. Estas son capaces de consumir ciertos metales pesados como oligoelementos necesarios para su proceso enzimático y metabolismo celular, como el boro, cobalto, cobre... Sin embargo, otros metales pesados como arsénico, cadmio, cromo, plomo y mercurio son tóxicos para las microalgas, aunque, a bajas concentraciones también puede estimular su crecimiento. Estas microalgas han desarrollado estrategias únicas de autoprotección contra la toxicidad de los metales pesados, como la inmovilización, la regulación génica, la exclusión y la quelación. Además, producen enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos para contrarrestar los radicales libres liberados durante la adsorción de los metales pesados. Las microalgas también son capaces de eliminar los metales pesados mediante un proceso de adsorción y acumulación dentro de la célula (Leong y Chang, 2020).

4.1.1 Macroalgas

Las macroalgas marinas, a veces conocidas como algas marinas, son organismos eucariotas, multicelulares y fotosintéticos. Dependiendo de su clasificación taxonómica y en función de su coloración, se pueden clasificar en tres grupos (Figura 2):

- a) Chlorophyta (verdes): la mayoría de las especies dentro de este grupo habitan en ambientes marinos, solo unos pocos géneros se encuentran en ecosistemas de agua dulce. Presentan tejidos diferenciados equivalentes a las raíces, tallos y hojas de los vegetales. Poseen pigmentos como la clorofila a y c y fucoxantina, responsable del color pardo distintivo de estas algas (Ecología verde, 2023).

- b) Rhodophyta (rojas): la mayoría de estas algas son marinas y viven sobre rocas, aunque algunas son epífitas. Poseen en sus cloroplastos pigmentos como clorofila a, carotenoides y ficobiliproteínas y estas últimas son las responsables de brindarles el color rojo característico (Ecología verde, 2023).
- c) Phaeophyceae (pardas): Las algas pertenecientes a este grupo poseen clorofila a y b, carotenoides y almacenan sustancias de reserva como el almidón. Tanto en ambientes marinos como de agua dulce, se pueden hallarse especies microscópicas y macroscópicas (Ecología verde, 2023).



Figura 2: Imagen de los tres tipos de macroalgas según su clasificación taxonómica: a) Chlorophyta, b) Rhodophyta y c) Phaeophyceae. (modificado de Ecología verde, 2023).

Muchos tipos de algas marinas son comestibles, proporcionan al cuerpo una variedad diferente de vitaminas y minerales críticos (incluido el yodo) cuando se consumen como alimento, y algunos también son ricos en proteínas y polisacáridos (El-Beltagi *et al.*, 2022). Actualmente, también se usan en varios productos industriales como materias primas como agar, alginato y carragenina. Hasta el momento, la producción anual de algas acuáticas mundiales aumentó más de 60 veces, de 0,56 millones de toneladas en 1950 a 35,82 millones de toneladas en 2019, con un 99,84 % de algas marinas y un 97 % aportado por el cultivo (Shao y Duan, 2022).

Las macroalgas tienen una amplia gama de usos potenciales. Han desarrollado mecanismos efectivos para sobrevivir a amenazas bióticas y condiciones ambientales extremas, lo que les permite producir metabolitos secundarios con funciones fisiológicas importantes (El-Beltagi

et al., 2022). Comercialmente, las macroalgas se utilizan en la generación de energía, biodegradación de aguas residuales, producción de biocombustibles, captura de dióxido de carbono, fabricación de productos químicos, extracción de compuestos con propiedades antivirales, antibacterianas o antitumorales, y también tienen aplicaciones en la nutrición humana y animal, agricultura y cosméticos (Leandro *et al.*, 2020).

Respecto al uso de macroalgas en agricultura, los extractos de algas marinas se han empleado para aumentar el rendimiento de los cultivos. Esta mejora se consigue estimulando diversos procesos fisiológicos implicados en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como mejorando la calidad del producto final. El uso de fertilizantes químicos presenta numerosas desventajas, por lo cual los agricultores han optado por cambiar a la agricultura orgánica en lugar de depender de fertilizantes agrícolas sintéticos. Esto se debe a la preferencia por alimentos frescos y libres de conservantes químicos. Debido a la disponibilidad de varios oligoelementos, vitaminas, reguladores del crecimiento o aminoácidos, los extractos de macroalgas se utilizan actualmente como pulverizaciones foliares para impulsar el crecimiento o la producción de una variedad de plantas a modo de biofertilizantes (El-Beltagi *et al.*, 2022).

4.1.2 Microalgas

Las microalgas son microorganismos unicelulares eucariotas que son fotosintéticos y con un estilo de vida acuático. Presentan un gran potencial como alternativas de recursos biológicos para diversas industrias. También incluyen, las cianobacterias procariotas (o 'algas verdeazuladas') (Pignolet *et al.*, 2013). Los componentes principales de las microalgas son los lípidos (7-23%), los carbohidratos (5-23%) y las proteínas (6-52%). Además, las microalgas contienen calcio (0,1-3,0%), magnesio (0,3-0,7%), fósforo (0,7-1,5%), potasio (0,7-2,4%), sodio (0,8-2,7%), azufre (0,4-1,4%), cobre (18-102 mg·kg⁻¹), hierro (1395-11.101 mg·kg⁻¹), manganeso (45-454 mg·kg⁻¹), selenio (0-0,5 mg·kg⁻¹), y zinc (28-64 mg·kg⁻¹) (Cinar *et al.*, 2020).

Dado que los desechos generados por la industria agroalimentaria mostraron un gran potencial para el cultivo mixotrófico de microalgas, las aplicaciones de estas están ganando interés en la agricultura (Pereira *et al.*, 2021). Se han realizado varios estudios para evaluar la eficiencia de la producción de biomasa de microalgas bajo diferentes residuos agroindustriales. Las microalgas también se están expandiendo en la agricultura debido al mayor uso de productos sostenibles como biopesticidas y biofertilizantes que se están introduciendo en el mercado

para reemplazar los agroquímicos. Las microalgas pueden sintetizar varios metabolitos con potencial control biológico de insectos y fitopatógenos y pueden traer beneficios al cultivo, como el crecimiento y el rendimiento de las plantas, debido a su capacidad para enriquecer el suelo con nutrientes y mejorar la utilización de macroalgas. y micronutrientes como resultado de la estimulación de la actividad microbiana del suelo (Murata *et al.*, 2021).

4.2. Aplicaciones de algas en agricultura

4.2.1. Estimulación del Crecimiento Vegetal (Biofertilizantes)

El uso de algas puede estimular el crecimiento de las plantas y, por tanto, actuar como fertilizante para técnicas agrícolas ambientalmente favorables y libres de contaminación. La producción agrícola en el mundo industrializado está determinada en gran medida por la naturaleza y el tipo de suelos. Las macroalgas se aplican en forma de extractos sobre las plantas. En cambio, las microalgas se adaptan a ambientes extremos y son extremadamente independientes de las alertas en las reservas de Nitrógeno terrestres, promotores del crecimiento y hormonas que se requieren para un buen crecimiento de los cultivos en los sistemas de cultivo. Su mecanismo de acción consiste en invadir la rizosfera rápidamente, promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas al convertir formas minerales inaccesibles en nutrientes necesarios a través de mecanismos como la fijación de nitrógeno, la mineralización y la solubilidad del fosfato de roca (Esraa *et al.*, 2022).

Los biofertilizantes son componentes importantes del proceso regulado de mineralización y fertilización en estas situaciones. Además de mejorar la fertilidad del suelo, las algas también pueden producir hormonas de crecimiento vegetal, polisacáridos y compuestos y metabolitos antimicrobianos que contribuyen a una mejor germinación de semillas, al crecimiento de las plantas y vida útil posterior a la cosecha y protección contra factores bióticos y abióticos (González-Pérez *et al.*, 2022). Por lo tanto, gracias al uso de algas como biofertilizantes, se puede reemplazar o complementar los fertilizantes químicos actualmente utilizados porque es rentable, ecológico y renovable. (Esraa *et al.*, 2022). A continuación, se resume algunos de los usos actuales de microalgas y macroalgas como biofertilizantes (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Compuesto de microalgas con actividad biofertilizante.

| Especie de alga | Compuesto/ extracto | Organismo diana | Organismo protegido | Características/ mecanismo de acción | Bibliografía |
|---------------------------|---------------------|-----------------|--------------------------|---|------------------------------------|
| <i>Chlorella fusca</i> | extractos alcalinos | - | cebollita y espinaca | efecto promotor del crecimiento volumétrico, aumento el grosor y número de hojas y la cantidad en peso fresco | (Kim <i>et al.</i> , 2018) |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | extractos alcalinos | - | lechuga, tomate y pepino | mejor germinación, mayor peso de brotes y raíces | (Asimakis <i>et al.</i> , 2022) |
| <i>Dunaliella salina</i> | polisacáridos | - | tomate | alivio del estrés salino, una mayor longitud y peso de sus sistemas de brotes y raíces, aumentó el crecimiento de las plantas, equilibró las proporciones de K ⁺ /Na ⁺ e indujo la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga | (EL Arroussi <i>et al.</i> , 2018) |

Tabla 2. Compuestos de macroalgas con actividad biofertilizante.

| Especie de alga | Compuesto/ extracto | Organismo diana | organismo protegido | Características/ mecanismo de acción | Bibliografía |
|----------------------------|-----------------------|--|--|---|-------------------------------|
| <i>Ascophyllum nodosum</i> | extractos alcalinos | <i>Rhizophagus irregularis</i> | <i>Medicago truncatula</i> | mejoró la formación de asociaciones de micorrizas aumentó la colonización de raíces y el tamaño de las plantas | (Hines <i>et al.</i> , 2021) |
| <i>Ascophyllum nodosum</i> | extractos alcalinos | <i>Xanthomonas campestris</i> pv., <i>vesicatoria</i> y <i>Alternaria solani</i> . | tomate y pimiento dulce | efecto estimulante del crecimiento vegetal y elicitador de defensa contra enfermedades foliares | (Ali <i>et al.</i> , 2019) |
| <i>Ascophyllum nodosum</i> | sustancias bioactivas | - | Soja, frijol, Arabidopsis, tomate, naranja dulce espinaca y limonero | reducido los efectos nocivos del estrés por sequía al regular una serie de respuestas moleculares, celulares y fisiológicas | (Shukla <i>et al.</i> , 2019) |
| <i>Ascophyllum nodosum</i> | alginato | - | fresa | aumento de los minerales disponibles para las plantas y una mayor aireación del suelo y capacidad de retención de agua. | (Shukla <i>et al.</i> , 2019) |

| Especie alga | de | Compuesto/ extracto | Organismo diana | organismo protegido | Características/ mecanismo de acción | Bibliografía |
|--|----|---------------------|-----------------|---------------------|---|--------------------------------|
| <i>Sargassum latifolium</i> <i>Corallina elongate</i> | y | extractos | - | trigo | Longitudes, peso fresco y seco del brote), así como, un aumento de clorofila a y b, y el contenido de carbohidratos y proteínas de los brotes | (Alharbi <i>et al.</i> , 2022) |

Los extractos de algas también son efectivos en la activación de mecanismos que protegen a las plantas del estrés oxidativo, que es causado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta respuesta se asocia principalmente con compuestos antioxidantes, como carotenoides, citoquininas, α -tocoferol y ácido ascórbico, así como con la activación de enzimas con actividad antioxidante, como peroxidasas, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y catalasa (Asimakis *et al.*, 2022).

4.2.2. Protección frente a enfermedades y plagas

Actividad antibacteriana

Las algas pardas tienen una amplia gama de compuestos que poseen una variedad de bioactividades prometedoras. Entre ellas se encuentra la actividad antimicrobiana contra bacterias fitopatógenas Gram-negativas y Gram-positivas (Vicente *et al.*, 2023). Dentro de esos compuestos químicos de algas, se incluyen alcaloides, polipéptidos, polisacáridos, florotaninos, diterpenos, esteroides, quinonas, lípidos y glicerol. Sin embargo, en algunos casos, los compuestos específicos con propiedades antibacterianas no están completamente dilucidados y la actividad se atribuye colectivamente a los extractos de algas. Algunos ejemplos se ilustran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Compuestos de macroalgas con actividad antibacteriana.

| Especie de alga | Compuesto / extracto | Organismo diana | Organismo protegido | Características/ mecanismo de acción | Bibliografía |
|--|----------------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------------|
| <i>Sargassum wightii</i> | extracto metanólico | <i>Pseudomonas syringae</i> | <i>Gymnema sylvestre</i> | Sulfoglicerolípido 1-O-palmitoil-3-O(6'-sulfo-a-quinovopiranosil)-glicerol presenta actividad antibacteriana para prevenir la enfermedad de la mancha foliar | (Vicente <i>et al.</i> , 2023) |
| <i>Gracilaria edulis</i> , <i>Sargassum wightii</i> y <i>Enteromorpha flexuosa</i> | extracto lipofílico y metanólico | <i>Xanthomonas oryzae</i> | arroz | - | (Vicente <i>et al.</i> , 2023) |
| <i>Cystoseira myriophylloides</i> y <i>Fucus spiralis</i> | extracto acuoso | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Tomate | reducción de la actividad de la enfermedad de la agalla de la corona por una mayor expresión de enzimas de defensa como la peroxidasa | (Esserti <i>et al.</i> , 2017) |
| <i>Padina gymnospora</i> | extracto metanólico | <i>Ralstonia solanacearum</i> y <i>Pectobacterium carotovorum</i> | patata | ácidos palmítico y oleico mostraron un efecto antibacteriano muy potente | (Borie <i>et al.</i> , 2017) |

Pese a que la mayoría de los estudios se realizan para las bacterias patógenas asociadas con el ganado, dichos agentes podrían probarse más como candidatos potenciales para aplicaciones fitosanitarias en agricultura. Por ejemplo, los diterpenos tetracíclicos bromados obtenidos del alga roja *Sphaerococcus coronopifolius* mostraron actividad antibacteriana contra un panel de cepas de *S. aureus* (Smyrniotopoulos *et al.*, 2010).

Acción antiviral

Los virus de las plantas son una seria amenaza para los cultivos agrícolas, afectando la calidad y el rendimiento de los productos y provocando graves pérdidas económicas. Recientemente, se han descubierto compuestos naturales de algas que exhiben propiedades antivirales y podrían ser recursos valiosos. Cabe destacar varios polisacáridos, como laminarinas,

agaranos, alginatos, carragenanos, que pueden funcionar como elicitores de mecanismos de defensa. (Asimakis *et al.*, 2022).

Los polisacáridos son los compuestos más comunes en los extractos de algas que inducen respuestas antivirales en las plantas. A continuación, se incluyen varios ejemplos (Tabla 4):

Tabla 4. Compuestos de macroalgas con actividad antiviral.

| Especie de alga | Compuesto / extracto | Organismo diana | Organismo protegido | Características / mecanismo de acción | Bibliografía |
|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------|---|-------------------------------|
| algas pardas (<i>Phaeophyceae</i>) | algonato de sodio | virus del mosaico del tabaco (TMV) | tabaco | inhibe la actividad del virus del tabaco TMV | (Sano, 1999) |
| <i>tichocarpus crinitus</i> | polisacárido kappa/beta-carragenina | virus del mosaico del tabaco (TMV) | tabaco | reduce la infección por el virus del mosaico del tabaco TMV | (Cheung <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>codium frágil</i> | extracto metanólico | virus X de la patata (PVX) | quinoa | reduce la expresión y secreción de mediadores inflamatorios inducidos por lipopolisacáridos tras la administración debido a la inhibición de la actividad de NF- κ B | (Cheung <i>et al.</i> , 2014) |

Aparte de los polisacáridos, las lectinas (proteínas de unión a carbohidratos) también muestran una importante acción antiviral. Por ejemplo, las lectinas del alga marina *Ulva pertusa* mostraron acción antiviral contra el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Asimakis *et al.*, 2022). De manera similar, los extractos acuosos y etanólicos del alga parda *Durvillaea antarctica* suprimieron el daño causado por TMV en hojas de tabaco (Jiménez *et al.*, 2011).

Acción antifúngica

Los compuestos derivados de algas están ganando terreno constantemente en las prácticas agrícolas modernas para controlar la infección por hongos, uno de los tipos de enfermedades más comunes en las plantas cultivadas. En su mayoría, se prefieren a los productos sintéticos, debido a su menor impacto ambiental, alta especificidad y rendimiento. Se utilizan directamente pulverizados de algas así como una gran variedad de extractos, como acuosos, alcohólicos y orgánicos (Asimakis *et al.*, 2022) (Tabla 5).

Tabla 5. Compuestos de macroalgas con actividad antifúngica.

| Especie de alga | Compuesto/ extracto | Organismo diana | Organismo protegido | Características/ mecanismo de acción | Bibliografía |
|---|--------------------------------------|------------------------------|------------------------|---|--------------------------------------|
| <i>Cystoseira myriophylloides</i> , <i>Laminaria digitat</i> y <i>Fucus spiralis</i> | extractos acuosos | <i>Verticillium dahliae</i> | tomate | efecto protector contra la enfermedad del marchitamiento | (Esserti <i>et al.</i> , 2017) |
| <i>Lessonia innamomica</i> | extractos orgánicos | <i>Botrytis cinerea</i> | tomate | reduce las lesiones necróticas | (Jiménez <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Gracillaria chilensis</i> | extractos acuosos y etanólicos | <i>Phytophthora innamomi</i> | in vitro | | (Ramkissoon <i>et al.</i> , 2017) |
| <i>Ulva lactuca</i> , <i>Sargassum filipéndula</i> y <i>Gelidium serrulatum</i> | extractos alcalinos | <i>Alternaria solani</i> | tomate | induce la activación de las defensas de plantas | (De Corato <i>et al.</i> , 2017) |

Al igual que se ha indicado en apartados anteriores, también existen polisacáridos de algas que han demostrado actividad antifúngica contra patógenos de plantas. El polisacárido de la pared celular laminarina obtenido del alga parda *Laminaria digitata* indujo una respuesta de defensa en hojas de vid frente al hongo *Botrytis cinerea*, reduciendo efectivamente la infección (Aziz *et al.*, 2003). Los extractos del heteropolisacárido ulvano de *Ulva* sp. redujeron significativamente la gravedad de la enfermedad de la mancha foliar, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en las hojas de manzano. La resistencia inducida se asoció con un aumento de la actividad de la peroxidasa, por lo que su acción está asociada con los mecanismos de defensa de las plantas, pese a no exhibir actividad antimicrobiana (Araujo y Stadnik, 2013)

Acción nematocida

Los extractos y compuestos de micro y macroalgas también son efectivos contra los nematodos parásitos de las plantas que son responsables de la pérdida anual del 10 al 25 % de la producción agrícola mundial. Algunos ejemplos se ilustran a continuación (Tabla 6 y 7):

Tabla 6. Compuestos de microalgas con actividad nematocida.

| Especie de alga | Compuesto / extracto | Organismo diana | Organismo protegido | Características / mecanismos de acción | Bibliografía |
|--------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------|--|---------------------------------|
| <i>Nostoc atcc 53789</i> | Extractos metanólicos | <i>Caenorhabditis elegans</i> | In vitro | Actividad nematocida | (Asimakis <i>et al.</i> , 2022) |

Tabla 7. Compuestos de macroalgas con actividad nematocida.

| Especie de alga | Compuesto / extracto | Organismo diana | Organismo protegido | Características / mecanismos de acción | Bibliografía |
|--|----------------------|----------------------------------|---------------------|---|---------------------------------|
| <i>Jania rubens</i> | Diterpenos bromados | <i>Allolobophora caliginiosa</i> | In vitro | Induce las defensas en plantas | (Asimakis <i>et al.</i> , 2022) |
| <i>Spatoglossum variable</i> , <i>Stokeyia indica</i> y <i>Melanothamnus afaqhusainii</i> | Polvos pulverizados | <i>Meloidogyne incognita</i> | Berenjena y sandía | Para reducir la formación de agallas y prevenir la penetración de nematodos en las raíces | (Baloch <i>et al.</i> , 2013) |
| <i>Ascophyllum nodosum</i> | Producto comercial | <i>Meloidogyne incognita</i> | Tomate | Redujo eficazmente el número de agallas y mejoro el crecimiento de las plantas | (Radwan <i>et al.</i> , 2012) |

Acción insecticida

Los extractos de macroalgas marinas que exhiben actividad insecticida pueden usarse en aplicaciones de manejo integrado de plagas como enfoques ecológicos para el control de la población de artrópodos. Estos biopesticidas son candidatos atractivos para la agricultura. Además, estos productos podrían tener una mejor aceptación ecológica en comparación con los compuestos químicos, es menos probable que sus objetivos desarrollen resistencia contra ellos (González-Castro *et al.*, 2019). Los compuestos bioactivos que se identificaron en los extractos, como era de esperar, cubren una amplia gama de estructuras químicas, incluidos polisacáridos, compuestos fenólicos, proteínas, terpenos, lípidos y compuestos halogenados. Algunos ejemplos se ilustran a continuación (Tabla 8):

Tabla 8. Compuestos de macroalgas con actividad insecticida.

| Espece de alga | Compuesto / extracto | Organismo diana | Organismo protegido | Características / mecanismos de acción | Bibliografía |
|--|----------------------------|---|---------------------|---|--|
| <i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>Laurencia johnstonii</i> y <i>Sargassum horridum</i> | Extractos de agua y etanol | <i>Diaphorina citri</i> | cítricos | Actividad insecticida y repelente contra mosquitos | (González-Castro <i>et al.</i> , 2019) |
| <i>Laurencia nidifica</i> | Sesquiterpenos | <i>Diaphorina citri</i> | Cítricos | Actividad larvicida | (González-Castro <i>et al.</i> , 2019) |
| <i>Laurencia nidifica</i> | laurinterol | <i>Sitophilus zeamais</i> y <i>Reticulitermes speratus</i> | - | Repele el gorgojo del maíz y presenta actividad insecticida contra termitas | (González-Castro <i>et al.</i> , 2019) |
| <i>Ulva lactuca</i> | Extracto metánolico | <i>Culex pipens</i> | - | Efecto insecticida | (Abbassy <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>Ulva lactuca</i> | Extracto etanólico | <i>Spodoptera littoralis</i> | - | Actividad larvicida contra el gusano de la seda | (Abbassy <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>Actinotrichia fragilis</i> , <i>Liagora ceranoides</i> y <i>Colpomenia sinuosa</i> | Aceite volátil | <i>Pediculus Pasdaran</i> , <i>Pediculus Hamedi</i> , <i>Peiduclus Mamedo</i> , <i>Pediculus Humanus capiti</i> , <i>Rhodnius prolixus</i> , <i>Triatoma infestans</i> | - | Provoca mortalidad de hasta el 80 % en las plagas de insectos | («Antibacterial and insecticidal activity of volatile compounds of three algae species of Oman Sea», 2016) |

Actividad herbicida

Los bioherbicidas naturales se han convertido en una herramienta útil para el manejo integrado de malezas herbáceas, un problema importante en la agricultura que se sabe que perjudica el crecimiento de las plantas cultivadas y reduce efectivamente el rendimiento de los cultivos. Varios metabolitos de algas, como las cianotoxinas que exhiben citotoxicidad, pueden servir como biocidas. Estas cianotoxinas tienen un gran potencial para desarrollar un compuesto biológico activo que podría aplicarse en campos de cultivo como insecticidas, herbicidas, alguicidas y fungicidas debido a sus efectos alelopáticos. Por lo tanto, la aplicación de estas cianotoxinas podría ayudar a restaurar la sostenibilidad ecológica (Singh *et al.*, 2017).

El alcaloide de indólico de la cianobacteria *Synechocystis aquatilis*, puede inhibir la germinación de malas hierbas, como *Avena fatua* y *Plantago lanceolata*, suprimir el crecimiento de *Portulaca oleracea*, *Echinochloa Crusgalli* y *Amaranthus retroflexus*. Por tanto, se ha propuesto como un potencial bioherbicida, valioso para controlar malezas en las fases de plántula y planta adulta (López-gonzález *et al.*, 2020).

Un azúcar, 7-desoxi-sedoheptulosa, que se aisló de la cianobacteria *Synechococcus elongatus*, inhibió el crecimiento de varios organismos fototróficos, incluidas algunas cianobacterias, así como levaduras y otras plantas (Brilisauer *et al.*, 2019). Sin embargo, al usar las toxinas de cianobacterianas es indispensable el estudio de sus posibles efectos tóxicos contra organismos que no son el objetivo, incluidos humanos, animales y plantas, y su bioacumulación en la cadena alimentaria (Asimakis *et al.*, 2022).

4.3. Edición genómica de algas para mejora de cultivos

Como ya se ha indicado anteriormente, las microalgas producen una amplia gama de bioproductos con numerosas potenciales aplicaciones. Por tanto, sería interesante poder usarlas como biofactorías, debido a su gran capacidad de producir biomasa, o simplemente modificarlas genéticamente para mejorar sus propiedades naturales, ya que se pueden aplicar directamente como se ha indicado en apartados anteriores.

Las técnicas de mejora del crecimiento y la ingeniería genética pueden utilizarse para mejorar su potencial como fuente futura de bioproductos renovables. Las microalgas no requieren tierra cultivable y agua dulce para el cultivo, no son comestibles, por lo tanto, no tienen ningún efecto en la cadena alimentaria humana y animal, se pueden cultivar independientemente de las condiciones estacionales, la concentración de CO₂ atmosférico y el tratamiento de aguas residuales. La ausencia de materiales lignocelulósicos en la pared celular de las microalgas facilita el proceso de pretratamiento y reduce el coste total de producción. Además, como se indicó anteriormente, podrían alimentarse de residuos de industrias agroalimentarias (Khan *et al.*, 2018).

El cultivo de microalgas a gran escala tiene el potencial de contribuir al desarrollo de una industria sostenible para la producción de biomasa y productos de alto valor. Su cultivo requiere luz como fuente de energía para la fotosíntesis, así como nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo y carbono. La temperatura, el pH y la salinidad también son factores importantes que afectan el crecimiento de las algas. El tipo de biorreactor utilizado en el cultivo de algas es un factor crucial, y existen diferentes opciones, como estanques abiertos,

sistemas de cultivo continuo o por lotes. La mezcla y la aireación son necesarias para garantizar una distribución uniforme de nutrientes, luz y gases, y evitar la sedimentación de las algas. Además, estudios recientes, revelan que el cultivo mixotrófico, que combina las características autótrofas y heterótrofas, puede aumentar la velocidad de crecimiento y la síntesis de compuestos en las microalgas (Khan *et al.*, 2018).

4.3.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

Gracias a la revisión bibliográfica llevada a cabo en este Trabajo Fin de Grado, se propone el posible uso de microalga *C. reinhardtii* en el marco de la nueva generación de herramientas biotecnológicas de protección de cultivos. *C. reinhardtii* es un alga unicelular de forma ovalada, con una pared celular compuesta de glicoproteínas y carbohidratos. Tiene un par de cilios en un polo y acumula vacuolas contráctiles cerca de ese polo (Figura 3). Posee un cloroplasto en forma de copa con gránulos de almidón y un pirenoide. También tiene un dominio especializado de membranas de cloroplasto llamado mancha ocular. Se reproduce asexualmente por división mitótica. *C. reinhardtii* se encuentra en una variedad de hábitats, desde suelos húmedos hasta agua dulce y marina, y muestra tolerancia a la contaminación (Salomé y Merchant, 2019).

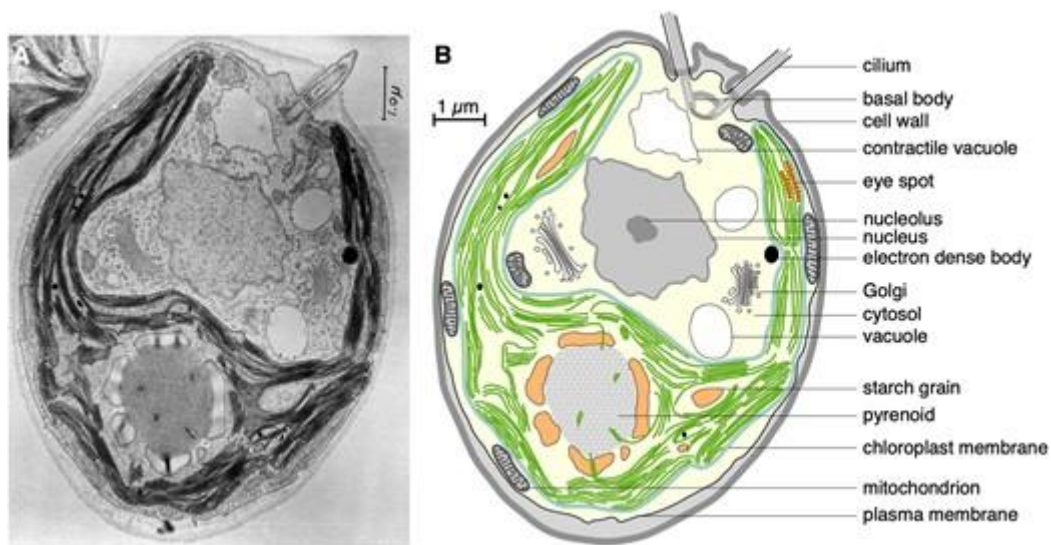


Figura 3: a) Micrografía electrónica de transmisión (TEM) de una célula. b) Dibujo de una célula de *C. reinhardtii* basado en la imagen TEM en a) (Salomé y Merchant, 2019).

Se trata un alga modelo de creciente interés como fábrica celular para la producción de compuestos valiosos, incluyendo proteínas terapéuticas y metabolitos bioactivos (Esland *et al.*, 2018). *C. reinhardtii* tiene un genoma haploide muy adecuado para la genética clásica, ya que las mutaciones de pérdida de función se expresan inmediatamente y es más probable

que conduzcan a fenotipos observables en comparación con los organismos diploides. *C. reinhardtii* no solo responde a la luz, sino que también anticipa transiciones ambientales como el amanecer y el atardecer bajo el control de un sistema circadiano, que coordina la división celular, la fotosíntesis y la biogénesis de los cilios (Salomé y Merchant, 2019).

4.3.2 Expresión del gen de la quitina sintetasa en *Chlamydomonas reinhardtii*

La quitina, es una macromolécula que consiste en unidades de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). Presenta propiedades fisicoquímicas y biológicas que permiten su uso en varias aplicaciones, como la formación de geles, películas, fibras y partículas, la quelación de metales pesados y la unión a proteínas. También actúan como biocidas y bioestimulantes en plantas (Giraldo et al., 2023). La aplicación de quitina en plantas se realiza a través de pulverización foliar, aplicación directa al suelo y recubrimiento de productos hortícolas para prolongar su vida útil. Se ha demostrado que la quitina tiene efectos bioestimulantes en los cultivos vegetales, mejorando la tolerancia a patógenos y promoviendo el crecimiento vegetal. Estas propiedades brindan ventajas sobre los agroquímicos convencionales, ya que los productos basados en estos biopolímeros no causan contaminación. A su vez existen otros derivados como el quitosano (quitina parcialmente desacetilada) que también han mostrado resultados prometedores en el control de plagas y enfermedades. (Shahrajabian et al., 2021).

Respecto a su síntesis, las reacciones clave de la biosíntesis de quitina son catalizadas por la quitina sintasa (CHS), una glicosiltransferasa integrada en la membrana que transfiere GlcNAc de UDP-GlcNAc a la cadena de quitina en formación. Esta pertenece a la familia glicosiltransferasa 2 (GT2). Se cree que la síntesis de quitina consta de tres pasos principales: I) la adición procesiva de GlcNAc de UDP-GlcNAc al grupo C4-hidroxilo terminal de la cadena de quitina naciente por el dominio catalítico de la enzima frente al lado citoplasmático, II) la liberación de la cadena naciente al espacio extracelular a través de un canal transmembrana dentro de la enzima; y III) el ensamblaje espontáneo de cadenas nacientes liberadas en nanofibrillas. CHS controla los dos primeros pasos de este proceso. A pesar de diferir en el número de hélices transmembrana y la organización de los respectivos dominios citosólicos, los CHS de varias especies comparten un dominio catalítico conservado (Chen et al., 2022).

Dado que el sustrato para CHS, UDP-GlcNAc, está presente de forma natural en *C. reinhardtii* para llevar a cabo procesos de glicosilación de proteínas, la hipótesis de partida es que sería posible producir quitina en esta microalga expresando heterológamente genes *CHS*

(aquí quedaría bien la referencia el genoma de *Chlamydomonas*). Así, este trabajo propone realizar un ensayo *knock-in* del gen de quitina sintetasa (*CHS*) del oomiceto *Phytophthora sojae*, mediado por Cas9 a través de la reparación dirigida por homología (HDR) en un gen de *C. reinhardtii*, con el objetivo que estas microalgas puedan incorporar este polisacárido en su pared celular y fortalecer la inmunoestimulación de las plantas (Zadabbas Shahabadi *et al.*, 2023).

Para ello, como se ha mencionado anteriormente, se aplica un sistema de *knock-in* del gen *CHS* con el fin de lograr una recombinación homóloga que asegure la estabilidad del transgén y reduzca los efectos del sitio de inserción o el silenciamiento génico. Para ello, se requiere: a) la proteína Cas9, b) diseño de genes diana y sgRNA, c) construcción de plásmidos donantes para la introducción de genes basados en CRISPR, d) preparación del complejo ribonucleoproteico (Zadabbas Shahabadi *et al.*, 2023).

En primer lugar, se seleccionará un exón del cromosoma de *C. reinhardtii* y se obtendrá la secuencia del gen a partir del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A continuación, se diseñarán sitios sgRNA mediante el uso de la herramienta en línea “CRISPR direct” (<https://crispr.dbcls.jp/>), para predecir la tasa de cambio de marco de lectura de cada RNA guía y evaluar su eficiencia. Para la síntesis del sgRNA, se utilizará una secuencia promotora, como T7 (5'-TAATACGACTCACTATA-3'), seguida de la secuencia de RNA guía específica del objetivo de 20 bases sin PAM y una secuencia de tracrRNA. Respecto, al ensamblaje del gen de la quitina sintasa, este está compuesto por el ancla, la enzima de restricción Kpn1, péptido señal, etiqueta de histidinas, gen de quitina optimizada, KDEL, enzima de restricción Nde1 y una zona de anclaje para su expresión en *C. reinhardtii*. Finalmente, para generar el plásmido donante para el sistema *knock-in* CRISPR, todos los fragmentos amplificados, que incluyen: los cebadores específicos (que presentan extremos superpuestos con brazos homólogos) y el vector (con el origen de replicación y genes de resistencia a ampicilina e higromicina que se utilizarán para el proceso de selección de las cepas recombinantes), se purificarán en gel, se ensamblarán y se transformarán en *E. coli* (DH5 α) (Zadabbas Shahabadi *et al.*, 2023).

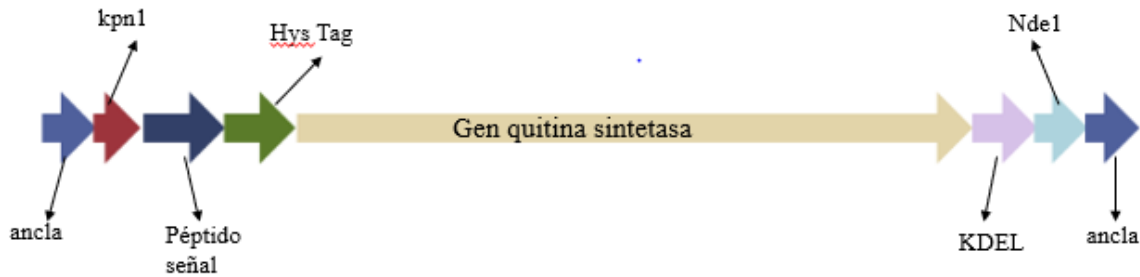


Figura 4: La construcción del gen quitina sintetasa que comprende el ancla, la enzima de restricción KpnI, péptido señal, etiqueta Hys, gen fitasa optimizado, KDEL, enzima restricción NdeI y ancla. (Imagen de elaboración propia empleando biorender).

Para el proceso de transformación de *C. reinhardtii*, se utilizará el método de perla de vidrio para transferir el complejo ribonucleoproteico y el plásmido donante. Para la recuperación celular, las células transformadas se cultivarán en condiciones específicas durante 24 horas y luego se sembrarán en placas con medio sólido suplementado con higromicina. Las colonias visibles, se seleccionan y se realizarán análisis por PCR, secuenciación y qPCR, mediante las cuáles se amplifican regiones específicas del genoma y del plásmido donante para confirmar la presencia del gen insertado y validar la edición del genoma. A su vez, también se realizará un análisis de expresión del gen de interés mediante qRT-PCR, utilizando cebadores específicos para amplificar región del gen de interés y cuantificar su expresión. Además, se realizará un análisis de crecimiento para evaluar si la estrategia de knock-in tenía un efecto negativo en el crecimiento celular (Zadabbas Shahabadi *et al.*, 2023). Posteriormente se propone llevar a cabo análisis bioquímicos para confirmar la presencia de quitina en la pared celular de *C. reinhardtii* o bien en el medio extracelular (Mélida *et al.*, 2013). Finalmente se llevarán a cabo ensayos de bioestimulación tras la aplicación del microalga o de extractos de la misma.

5. CONCLUSIONES

La revisión bibliográfica llevada a cabo durante el presente Trabajo Fin de Grado ha permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

- 1- La agricultura desempeña un papel fundamental para nuestra sociedad, sin embargo, actualmente enfrenta diversas amenazas que podrían limitar su producción en el presente y en el futuro. Además, en la actualidad se persigue la introducción de técnicas agrícolas que sean sostenibles con el medio ambiente.

- 2- Existen diferentes especies de algas, tanto macroalgas como microalgas, que desempeñan importantes funciones en la agricultura. Los extractos de algas se utilizan como biofertilizantes para mejorar el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Además, poseen compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas, lo que las convierte en candidatas prometedoras para el desarrollo de biopesticidas que mejoren la calidad de los cultivos y controlen enfermedades y plagas.
- 3- La edición genómica de microalgas, como *Chlamydomonas reinhardtii*, tiene un gran potencial para mejorar los cultivos y desarrollar una industria sostenible de bioproductos renovables. Una posible aplicación es la expresión heteróloga del gen de la quitina sintetasa, que podría provocar la acumulación del polisacárido inmunoestimulante de las plantas quitina en dicho microalga.

6. REFERENCIAS

- Abbassy, M. A., Marzouk, M. A., Rabea, E. I., y Abd-Elnabi, A. D. (2014). Insecticidal and Fungicidal Activity of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) Extracts and their Fractions. En *Original Research Article Annual Research & Review in Biology* (Vol. 4, Número 13). www.sciencedomain.org
- Alharbi, K., Amin, M. A., Ismail, M. A., Ibrahim, M. T. S., et al (2022). Alleviate the Drought Stress on *Triticum aestivum* L. Using the Algal Extracts of *Sargassum latifolium* and *Corallina elongate* Versus the Commercial Algal Products. *Life*, *12*(11). <https://doi.org/10.3390/life12111757>
- Algase, (2023). Disponible en: <https://www.algaebase.org/>. (Accedido el 15 de Junio de 2023).
- Ali, O., Ramsubhag, A., & Jayaraman, J. (2019). Biostimulatory activities of *Ascophyllum nodosum* extract in tomato and sweet pepper crops in a tropical environment. *PLoS ONE*, *14*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216710>
- Antibacterial and insecticidal activity of volatile compounds of three algae species of Oman Sea. (2016). *International Journal of Secondary Metabolite*, 66-73. <https://doi.org/10.21448/http-ijate-net-index-php-ijsm.243308>
- Araujo, L., & Stadnik, M. J. (2013). Resistências cultivar-específica e induzida por ulvana à mancha foliar de *Glomerella* em macieira são associadas com aumento da atividade de peroxidases. *Acta Scientiarum - Agronomy*, *35*(3), 287-293. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.16174>
- Asimakis, E., Shehata, A. A., Eisenreich, W., Acheuk, F., et al (2022). Algae and Their Metabolites as Potential Bio-Pesticides. En *Microorganisms* (Vol. 10, Número 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020307>
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., et al (2003). Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. En *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI* (Vol. 16, Número 12).
- Baloch, G. N., Tariq, S., Ehteshamul-Haque, S., Athar, M., et al(2013). Management of root diseases of eggplant and watermelon with the application of asafetida and seaweeds. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *86*(1), 138-142. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.019>
- Banco Mundial, (2023). Disponible en: Agricultura y alimentos (bancomundial.org). (Accedido: 26 de Mayo de 2023).
- Borie, I., Ibraheem, M., Moussa, S., & Abdel-Raouf, N. (2017). *Antimicrobial activities of some brown macroalgae against some soil borne plant pathogens and in vivo management of Solanum melongena root diseases*. <https://www.researchgate.net/publication/317007379>
- Brilisauer, K., Rapp, J., Rath, P., Schöllhorn, A., et al (2019). Cyanobacterial antimetabolite 7-deoxy-sedoheptulose blocks the shikimate pathway to inhibit the growth of prototrophic organisms. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08476-8>
- Chen, W., Cao, P., Liu, Y., Yu, A., et al (2022). Structural basis for directional chitin biosynthesis. *Nature*, *610*(7931), 402-408. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05244-5>
- Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Pan, W. L., Chan, Y. S., et al (2014). Antifungal and antiviral products of marine organisms. En *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 98, Número 8, pp. 3475-3494). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5575-0>
- Cinar, S. O., Chong, Z. K., Kucuker, M. A., Wiczorek, N., et al (2020). Bioplastic production from microalgae: A review. En *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Número 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113842>
- De Corato, U., Salimbeni, R., De Pretis, A., Avella, N., et al (2017). Antifungal activity of crude extracts from brown and red seaweeds by a supercritical carbon dioxide technique against fruit postharvest fungal diseases. *Postharvest Biology and Technology*, *131*, 16-30. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.04.011>

- El Arroussi, H., Benhima, R., Elbaouchi, A., Sijilmassi, B., et al (2018). Dunaliella salina exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2929-2941. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1382-1>
- El-Beltagi, H. S., Mohamed, A. A., Mohamed, H. I., Ramadan, K. M. A., et al (2022). Phytochemical and Potential Properties of Seaweeds and Their Recent Applications: A Review. En *Marine Drugs* (Vol. 20, Número 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/md20060342>
- Esland, L., Larrea-Alvarez, M., & Purton, S. (2018). Selectable markers and reporter genes for engineering the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. En *Biology* (Vol. 7, Número 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology7040046>
- Esserti, S., Smaili, A., Rifai, L. A., Koussa, T., et al (2017). Protective effect of three brown seaweed extracts against fungal and bacterial diseases of tomato. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 1081-1093. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0996-z>
- Fincheira, P., Tortella, G., Seabra, A. B., Quiroz, A., et al (2021). Nanotechnology advances for sustainable agriculture: current knowledge and prospects in plant growth modulation and nutrition. En *Planta* (Vol. 254, Número 4). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03714-0>
- Giraldo, J. D., Garrido-Miranda, K. A., & Schoebitz, M. (2023). Chitin and its derivatives: Functional biopolymers for developing bioproducts for sustainable agriculture—A reality? En *Carbohydrate Polymers* (Vol. 299). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120196>
- González-Castro, A. L., Muñoz-Ochoa, M., Hernández-Carmona, G., y López-Vivas, J. M. (2019). Evaluation of seaweed extracts for the control of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3815-3821. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01896-5>
- González-Pérez, B. K., Rivas-Castillo, A. M., Valdez-Calderón, A., y Gayosso-Morales, M. A. (2022). Microalgae as biostimulants: a new approach in agriculture. En *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 38, Número 1). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03192-2>
- Gupta, A., Singh, U. B., Sahu, P. K., Paul, S., et al (2022). Linking Soil Microbial Diversity to Modern Agriculture Practices: A Review. En *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 19, Número 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph19053141>
- Hamdan, M. F., Noor, S. N. M., Abd-Aziz, N., Pua, T. L., et al (2022). Green Revolution to Gene Revolution: Technological Advances in Agriculture to Feed the World. En *Plants* (Vol. 11, Número 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11101297>
- Hines, S., van der Zwan, T., Shiell, K., Shotton, K., et al (2021). Alkaline extract of the seaweed *Ascophyllum nodosum* stimulates arbuscular mycorrhizal fungi and their endomycorrhization of plant roots. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93035-9>
- Jiménez, E., Dorta, F., Medina, C., Ramírez, A., et al (2011). Anti-phytopathogenic activities of macroalgae extracts. *Marine Drugs*, 9(5), 739-756. <https://doi.org/10.3390/md9050739>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. En *Microbial Cell Factories* (Vol. 17, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kim, M. J., Shim, C. K., Kim, Y. K., Ko, B. G., et al (2018). Effect of biostimulator *Chlorella fusca* on improving growth and qualities of chinese chives and spinach in organic farm. *Plant Pathology Journal*, 34(6), 567-574. <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.11.2018.0254>
- Leandro, A., Pereira, L., y Gonçalves, A. M. M. (2020). Diverse applications of marine macroalgae. En *Marine Drugs* (Vol. 18, Número 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md18010017>
- Leong, Y. K., & Chang, J. S. (2020). Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. En *Bioresour. Technol.* (Vol. 303). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122886>

- López-gonzález, D., Ledo, D., Cabeiras-freijanes, L., Verdeguer, M., Reigosa, et al (2020). Phytotoxic activity of the natural compound norharmane on crops, weeds and model plants. *Plants*, 9(10), 1-23. <https://doi.org/10.3390/plants9101328>
- Mahapatra, D. M., Satapathy, K. C., y Panda, B. (2022). Biofertilizers and nanofertilizers for sustainable agriculture: Phycoprosects and challenges. En *Science of the Total Environment* (Vol. 803). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149990>
- Murata, M. M., Ito Morioka, L. R., Da Silva Marques, J. B., Bosso, A., et al (2021). What do patents tell us about microalgae in agriculture? En *AMB Express* (Vol. 11, Número 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01315-4>
- Naciones Unidas, (2023). Disponible en: <https://www.un.org/es/global-issues/population>. (Accedido: 15 de Mayo de 2023).
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, (2023). Disponible en: <https://www.fao.org/3/cb4769es/online/src/html/global-pests-affecting-crops-forestry-and-ecosystems.html>. (Accedido: 6 de Junio de 2023).
- Pereira, I., Rangel, A., Chagas, B., de Moura, B., et al (2021). Microalgae Growth under Mixotrophic Condition Using Agro-Industrial Waste: A Review. En *Biotechnological Applications of Biomass*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93964>
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., y Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects. En *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Vol. 40, Número 8, pp. 781-796). <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1281-7>
- Radwan, M. A., Farrag, S. A. A., Abu-Elamayem, M. M., y Ahmed, N. S. (2012). Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology*, 56, 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.008>
- Raman, R. (2017). The impact of Genetically Modified (GM) crops in modern agriculture: A review. En *GM Crops and Food* (Vol. 8, Número 4, pp. 195-208). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/21645698.2017.1413522>
- Ramkisson, A., Ramsubhag, A., y Jayaraman, J. (2017). Phytoelicitor activity of three Caribbean seaweed species on suppression of pathogenic infections in tomato plants. *Journal of Applied Phycology*, 29(6), 3235-3244. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1160-0>
- Roy, A., Gogoi, N., Yasmin, F., y Farooq, M. (2022). The use of algae for environmental sustainability: trends and future prospects. En *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 29, Número 27, pp. 40373-40383). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19636-7>
- Salomé, P. A., y Merchant, S. S. (2019). A series of fortunate events: Introducing chlamydomonas as a reference organism. En *Plant Cell* (Vol. 31, Número 8, pp. 1682-1707). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00952>
- Sano, Y. (1999). Antiviral activity of alginate against infection by tobacco mosaic virus, *National Food Research Institute*, 183-186.
- Shahrajabian, M. H., Chaski, C., Polyzos, N., Tzortzakis, N., y Petropoulos, S. A. (2021). Sustainable agriculture systems in vegetable production using chitin and chitosan as plant biostimulants. En *Biomolecules* (Vol. 11, Número 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom11060819>
- Shao, Z., y Duan, D. (2022). The Cell Wall Polysaccharides Biosynthesis in Seaweeds: A Molecular Perspective. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.902823>
- Shukla, P. S., Mantin, E. G., Adil, M., Bajpai, S., Critchley, A. T., et al (2019). Ascophyllum nodosum-based biostimulants: Sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00655>

- Singh, R., Parihar, P., Singh, M., Bajguz, A., et al (2017). Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: Current status and future prospects. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Número APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00515>
- Smyrniotopoulos, V., Vagias, C., Rahman, M. M., Gibbons, S., et al (2010). Structure and antibacterial activity of brominated diterpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Chemistry and Biodiversity*, 7(1), 186-195. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800309>
- Unión Europea de Observación para nanomateriales (2022). Disponible en: <https://euon.echa.europa.eu/es/definition-of-nanomaterial>. (Accedido: 8 de Julio de 2023).
- Vicente, T. F. L., Félix, C., Félix, R., Valentão, P., et al (2023). Seaweed as a Natural Source against Phytopathogenic Bacteria. En *Marine Drugs* (Vol. 21, Número 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/md21010023>
- Zadabbas Shahabadi, H., Akbarzadeh, A., Ofoghi, H., y Kadkhodaei, S. (2023). Site-specific gene knock-in and bacterial phytase gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* via Cas9 RNP-mediated HDR. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1150436>
- Zhang, D., Zhang, Z., Unver, T., y Zhang, B. (2021). CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. En *Journal of Advanced Research* (Vol. 29, pp. 207-221). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.10.003>
- Zulfiqar, F., Navarro, M., Ashraf, M., Akram, N. A., et al (2019). Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations. En *Plant Science* (Vol. 289). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110270>