



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

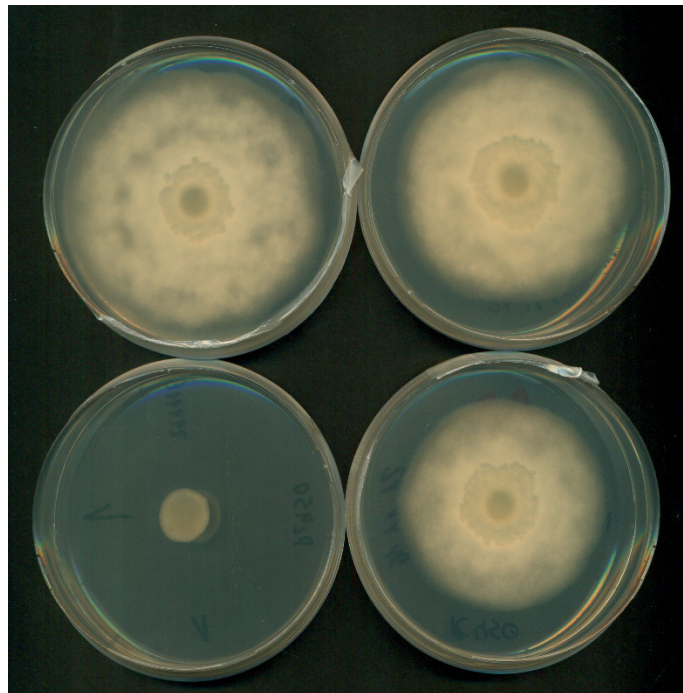
Facultade de Ciencias

## **Memoria del Trabajo de Fin de Grado**

**Evaluación de las propiedades fungicidas del ácido salicílico frente a hongos patógenos**

**Avaliación das propiedades funxicidas do ácido salicílico fronte a fungos patóxenos**

**Evaluation of fungicide properties of salicylic acid against fungal pathogens**



Pablo Sánchez Seoane

Junio 2017

Tutores del trabajo: José Díaz Varela y Javier Veloso Freire



D. JOSÉ DÍAZ VARELA, PROFESOR TITULAR DE FISIOLOXÍA VEXETAL, DOUTOR EN BIOLOXÍA, E D. JAVIER VELOSO FREIRE, CONTRATADO POSDOUTORAL, DOUTOR EN BIOLOXÍA, DO DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA DA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que o presente Traballo de Fin de Grado presentado polo alumno PABLO SANCHEZ SEOANE e titulado

“Evaluación de las propiedades fungicidas del ácido salicílico frente a hongos patógenos”

“Avaliación das propiedades funxicidas do ácido salicílico fronte a fungos patóxenos”

“Evaluation of fungicide properties of salicylic acid against fungal pathogens”

foi realizado baixo a súa dirección e autorizan a súa presentación para que poida ser xulgado polo tribunal correspondente.

E para que así conste, expiden e asinan o presente informe en A Coruña, a 19 de Xuño de 2017.

**DIAZ  
VARELA  
JOSE -  
32782379L**

Firmado digitalmente por DIAZ  
VARELA JOSE - 32782379L  
Nombre de reconocimiento  
(DN): c=ES,  
serialNumber=32782379L,  
sn=DIAZ VARELA,  
givenName=JOSE, cn=DIAZ  
VARELA JOSE - 32782379L  
Fecha: 2017.06.19 10:09:22  
+02'00'

Asdo. José Díaz Varela

**VELOSO  
FREIRE  
JAVIER -  
44836782F**

Digitally signed by VELOSO  
FREIRE JAVIER - 44836782F  
DN: c=ES,  
serialNumber=44836782F,  
sn=VELOSO FREIRE,  
givenName=JAVIER,  
cn=VELOSO FREIRE JAVIER  
- 44836782F  
Date: 2017.06.19 09:17:21  
+02'00'

Asdo. Javier Veloso Freire

## Índice

Resumen/ Resumo/ Summary .....	3
1. Introducción.....	4
1.1 <i>Botrytis cinerea</i> .....	4
1.2 <i>Phytophthora capsici</i> .....	5
1.3 Pimiento ( <i>Capsicum annuum</i> ).....	7
1.4 Ácido salicílico.....	8
1.5 Resistencia mediada por ácido salicílico.....	9
2. Objetivos .....	10
3. Material y métodos .....	10
3.1 Material fúngico.....	10
3.2 Material vegetal.....	10
3.3 Ensayo en placa.....	10
3.4 Ensayo en planta .....	11
3.4.1 Tratamiento.....	11
3.4.2 Inoculación.....	11
3.4.3 Evaluación de síntomas.....	12
3.5 Análisis de datos .....	12
4. Resultados .....	12
4.1 Resultados: ensayos en placa .....	12
4.1.1 <i>Botrytis cinerea</i> .....	12
4.1.2 <i>Phytophthora capsici</i> .....	14
4.2 Resultados: ensayos en planta .....	16
4.2.1 Protección local .....	16
4.2.2 Resistencia sistémica .....	16
5. Discusión.....	17
6. Conclusiones/ Conclusións/ Conclusions.....	19
7. Bibliografía .....	20

## Resumen

El ácido salicílico es una hormona vegetal de naturaleza fenólica que juega un papel fundamental en la respuesta inmune de las plantas. Esta fitohormona se asocia con un tipo de respuesta que incluye a la resistencia sistémica adquirida (SAR). La SAR es dependiente del ácido salicílico, tanto en la respuesta local de los tejidos infectados como para la respuesta sistémica en los tejidos distales. Se desconoce el efecto directo que puede ejercer el ácido salicílico sobre los patógenos. Se sabe que los fenoles pueden poseer actividad antimicrobiana, por ello, en este trabajo se pretende determinar si el propio ácido salicílico presenta propiedades fungicidas. Las pruebas en placa muestran inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici* y en menor medida de *Botrytis cinerea*. Los resultados solo permitieron calcular la ED50 (cantidad necesaria para reducir a la mitad el crecimiento) en el caso de *P. capsici* (459,72  $\mu$ M SA), con *Botrytis* no fue posible calcularlo ya que la toxicidad fue baja. Al aplicar los tratamientos de SA en planta, no se observó la reducción de los síntomas de *P. capsici*.

## Resumo

O ácido salicílico é una hormona vexetal de natureza fenólica que xoga un papel fundamental na resposta inmune das plantas. Esta fitohormona asociase cun tipo de resposta que inclúe a resistencia sistémica adquirida (SAR). A SAR é dependente do ácido salicílico, tanto nas respostas locais nos tecidos infectados como para a resposta sistémica nos tecidos distais. Descoñécese o efecto directo que o ácido salicílico pode causar nos patóxenos. Sábese que os fenois poden posuír propiedades antimicrobianas, por isto, neste traballo pretendese determinar se o propio ácido salicílico presenta propiedades funxicidas. As probas amosan inhibición do crecemento de *Phytophthora capsici* e en menor medida de *Botrytis cinerea*. Os resultados só permitiron calcular a ED50 (cantidade necesaria para reducir á metade o crecemento) no caso de *P. capsici* (459,72  $\mu$ M SA), con *B. cinerea* non foi posible calculalo xa que a toxicidade foi baixa. Ó aplicar os tratamentos de SA en planta, non se observou a redución dos síntomas de *P. capsici*.

## Summary

The salicylic acid is a phenolic plant hormone that plays a key role in the immune response of the plants. This plant hormone is related to a kind of response that includes the systemic acquired resistance (SAR). SAR is totally dependent on the salicylic acid, in both local response in the infected tissues and systemic response in distant tissues. The direct effect of salicylic acid on pathogens is still unknown. It is known that phenolic compounds might have antimicrobial properties, therefore, this work will determine whether salicylic acid can show fungicidal properties. The results show inhibition of the growth of *Phytophthora capsici* and also in a lesser extent of *Botrytis cinerea*. The results only allowed to calculate the ED50 (Effective dose or the concentration that reduces growth to the half) for *P. capsici* (459.72  $\mu$ M SA), but it could not be calculated for *B. cinerea* since the toxicity was much lower. SA treatments to the plant were not effective in reducing the symptoms of *P. capsici*.

## 1. Introducción

### 1.1 *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinerea* Pers.:Fr., también conocido como *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel en su estado teleomorfo, es un hongo fitopatógeno necrótrofo que causa importantes daños en más de 200 especies vegetales, fundamentalmente en dicotiledóneas.

Clasificación taxonómica: Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Subfilo: Perizomycotina; Clase: Leotiomycetes; Orden: Helotiales; Familia: Sclerotiniaceae; Genero: Botryotinia; Especie: *Botrytis cinerea* Pers.:Fr/*Botrytonia fuckeliana* (de Bary) Whetzel

El esclerocio se desarrolla en los tejidos muertos del huésped (Figura 1). A comienzos de primavera comienza a crecer para producir conidios multinucleados. El ciclo sexual implica la espermatización del esclerocio, del que se formará un apotecio que contiene ascas con 8 ascosporas binucleadas. Las conidiosporas son liberadas al aire individualmente o en grupos, aunque también se dispersan en gotas de agua (Williamson *et al.* 2007).

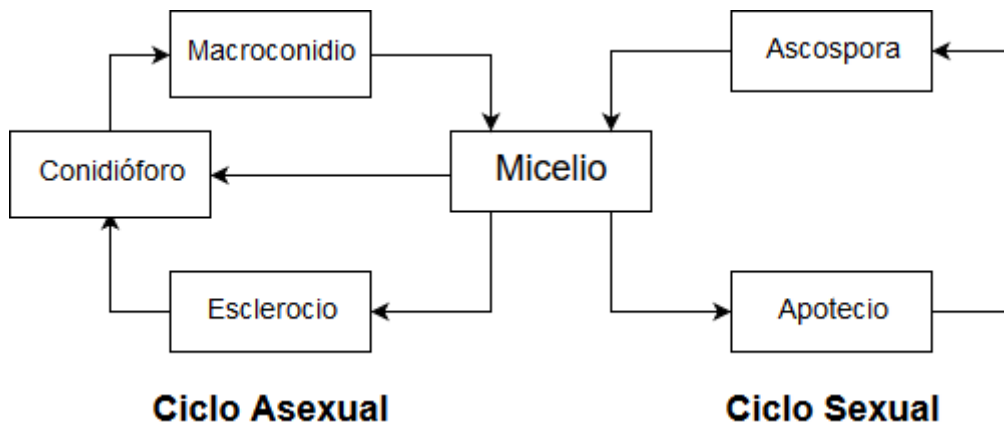


Figura 1. Ciclo de vida de *Botrytis cinerea*.

Para penetrar en los tejidos vegetales, atravesando la cutícula, *B. cinerea* desarrolla una estructura denominada apresorio. Esta estructura genera una presión física sobre la cutícula, aunque no la suficiente como para poder penetrarla. La pared del apresorio no contiene suficiente melanina como para generar la presión de turgencia necesaria, como ocurre en otros hongos. Por tanto, para que la penetración sea posible, es necesaria la acción de enzimas, excretándose fundamentalmente cutinasas y lipasas. Además, durante el proceso se genera  $H_2O_2$ , que actuaría como sustrato para las oxidasas. Dada la composición de la pared vegetal, las pectinasas son necesarias para que se produzca la penetración, en especial la endopoligalacturonasa BcPG2 (van Kan 2006).

Debido a la alimentación necrótrofa del hongo es necesario que, una vez se produzca la infección, se desencadene un proceso de muerte celular en la planta. El mecanismo del hongo consiste en la secreción de diversas sustancias nocivas para la planta que producen la muerte celular y el avance en el crecimiento del micelio, produciendo una podredumbre húmeda que libera los nutrientes de los que se alimenta el hongo (visión general de la infección por *Botrytis*, moho gris, en fresa. Figura 2). Son capaces de secretar ácido oxálico y diferentes toxinas,

siendo la más estudiada el botridial. Algunas cepas pueden producir otras toxinas diferentes (van Kan 2006).



Figura 2. Detalle de una infección en una fresa por parte de *Botrytis cinerea*. Fuente: [es.wikipedia.org/wiki/Botrytis\\_cinerea](https://es.wikipedia.org/wiki/Botrytis_cinerea)

Los síntomas de la infección del hongo dependen de la planta y los tejidos, pero son más evidentes en frutos y bayas, causando la enfermedad conocida como “podredumbre gris” (Figura 2). Los síntomas conllevan una pérdida de coloración seguida de la aparición de zonas necróticas. Los tejidos pierden turgencia y adquieren una consistencia frágil (Latorre *et al.* 2015).

### 1.2 *Phytophthora capsici*

*Phytophthora capsici* Leon. es un pseudohongo hemibiotrofo patógeno de todas las plantas cucurbitáceas y muchas solanáceas. Los tratamientos actuales contra este patógeno, tanto químicos como biológicos, no son completamente efectivos, por lo que entre los métodos de control se incluyen medidas de prevención como impedir su dispersión por el agua de riego.

Clasificación taxonómica: Reino: Protocista; Filo: Oomycota; Clase: Oomycetes; Orden: Peronosporales; Familia: Peronosporaceae; Género: *Phytophthora*; Especie: *Phytophthora capsici* Leon.

*Phytophthora capsici* es un oomiceto heterotálico (Figura 3) en el que se diferencian dos tipos de hifas, denominadas A1 y A2. Cuando se produce el encuentro entre ambos tipos de hifa, comienza la diferenciación del oogonio. Los anteridios formados van a crecer en dirección al gametangio femenino, donde tiene lugar la meiosis. Las esporas que se forman tras este fenómeno son altamente resistentes y requieren de un periodo de inactividad antes de germinar. Después de que se produzca la germinación de las oosporas, el micelio que se genera formará los esporangios (Lamour *et al.* 2012).

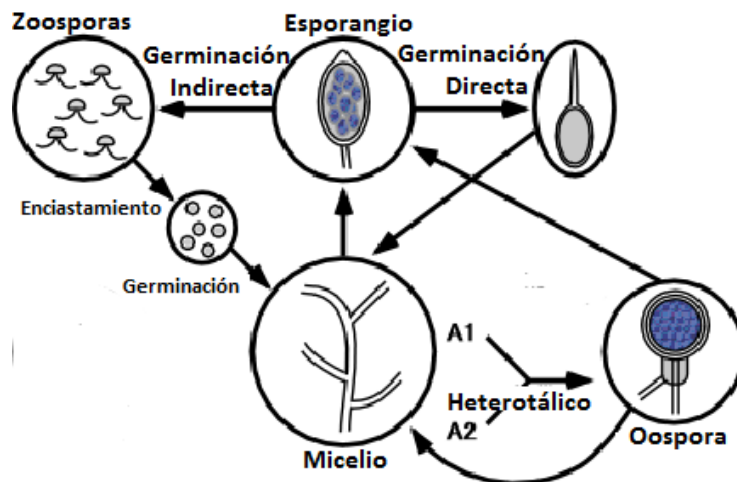


Figura 3. Ciclo de vida de *Phytophthora capsici*. Fuente: [en.wikipedia.org/wiki/Phytophthora\\_capsici](https://en.wikipedia.org/wiki/Phytophthora_capsici). Imagen original modificada por el autor.

Los esporangios forman zoosporas biflageladas con geotropía negativa, que son atraídas quimiotácticamente por gradientes de nutrientes. Cuando una zoospora alcanza la superficie de una planta pierde un flagelo y se adhiere a su superficie produciendo un tubo germinativo. El tubo germinativo junto con la acción de enzimas permite penetrar la cutícula. La infección acaba produciendo el colapso del tejido y la esporulación del hongo. Al comienzo de la infección, las células no muestran síntomas de estar afectadas, aunque acaban causando necrosis y colapsando el tejido. Finalmente emergen los esporangios (Lamour *et al.* 2012).

Los síntomas de la enfermedad varían entre el tipo de plantas y tejidos donde se produzca la infección (Figura 4). En pimiento y tomate se ven afectadas tanto las raíces como las partes aéreas, mostrándose lesiones negras-marrones. Las cucurbitáceas muestran mayor resistencia en las raíces, por lo que es habitual que la infección aparezca en el fruto (Hausbeck y Lamour 2004; Lamour *et al.* 2012).



Figura 4. Planta de calabaza con síntomas de infección radicular por *Phytophthora capsici*. Fuente: [en.wikipedia.org/wiki/Phytophthora\\_capsici](https://en.wikipedia.org/wiki/Phytophthora_capsici)



### 1.3 Pimiento (*Capsicum annuum*)

La especie *Capsicum annuum* L. incluye la mayor parte de las variedades de pimiento cultivadas actualmente (Figura 5). Uno de los puntos de producción más importantes se localiza en torno al Mediterráneo, especialmente España e Italia (Figura 6), aunque China es el mayor productor del mundo (FAO 2017).



Figura 5. Planta de pimiento. Fuente: Pixabay.com/es/bloom-jardín-verde-pimienta-planta-88520/

Clasificación taxonómica: Reino: Plantae; Filo: Tracheophyta; Subfilo: Spermatophytina; Clase: Magnoliopsida; Orden: Solanales; Familia: Solanaceae; Genero: *Capsicum*; Especie: *Capsicum annuum* L.

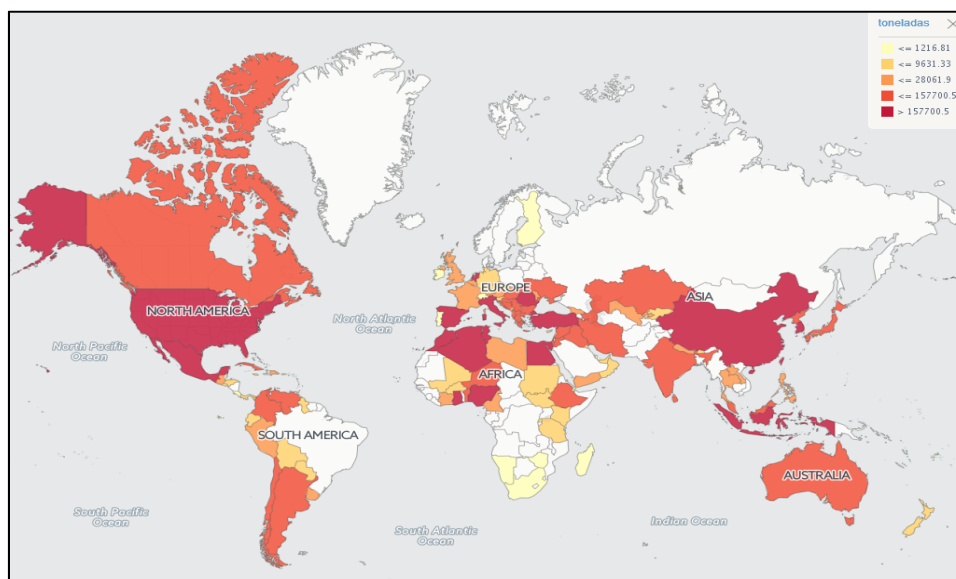


Figura 6. Datos de producción media de chile y pimiento (verde) entre el 2000-2014. Fuente: FAOSTAT

Una de las mayores amenazas para la producción de pimiento es *Phytophthora capsici*, estando presente en la mayor parte de las infecciones por hongos en plantas de pimiento (Pomar *et al.* 2001), aunque *Botrytis cinerea* también supone un problema importante (FAO 2002). El motivo de la abundancia de *Botrytis cinerea* es que las condiciones de infección son óptimas en los lugares de cultivo



del pimiento, los invernaderos, ya que se dan condiciones de alta humedad, necesaria para el hongo.

#### 1.4 Ácido salicílico

El ácido salicílico (SA) es un compuesto fenólico que, como fitohormona, está involucrado en los procesos de resistencia local y resistencia sistémica adquirida (SAR). Su forma acetilada está ampliamente extendida en la industria farmacéutica.

Existen dos rutas conocidas de síntesis de SA (Figura 7). Una de ellas es la ruta fenilpropanoide que tiene lugar en el citoplasma. La fenilalanina es convertida a ácido trans-cinámico, mediado por una fenilalanina-amonio liasa (PAL). Este es convertido a ácido benzoico, que finalmente, formará ácido salicílico, catalizado por una ácido benzoico 2-hidroxilasa (BA2H). La otra ruta tiene lugar en el cloroplasto y comienza con el corismato. Este es convertido a isocorismato por una isocorismato sintasa (ICS). Finalmente se forma el ácido salicílico, por una reacción catalizada por una isocorismato piruvato liasa (IPL) (Sendon *et al.* 2011).

El ácido salicílico puede aparecer conjugado o modificado en formas inactivas (Figura 7). Para ser transportado por el floema, aparece en forma de salicilato de metilo (MeSA), una forma inactiva que puede ser reconvertida en SA en tejidos distantes de la zona de infección mediante una esterasa llamada SA-binding protein 2 (SABP2). La formación de MeSA está mediada por una metiltransferasa (SAMT) (Fu y Dong 2013).

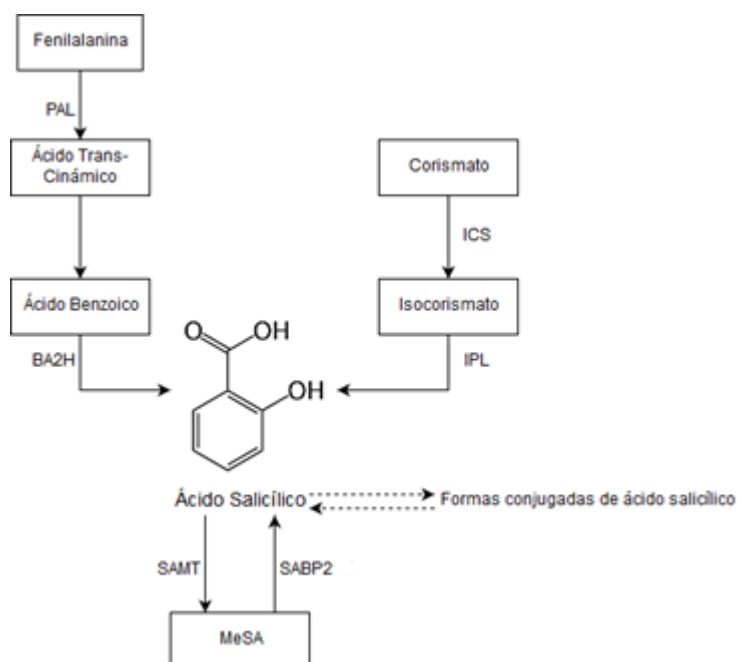


Figura 7. Esquema de las dos rutas biosintéticas del ácido salicílico.

El SA no suele ser considerado como un compuesto con actividad fungicida directa. Existen pocos estudios al respecto, sin embargo, muestran cierta actividad fungicida de este compuesto. A concentraciones de 1 mM SA se produce una fuerte inhibición de ciertos hongos (Amborabé *et al.* 2002; Zabka y Pavela 2013; Dieryckx *et al.* 2015) que puede ser debida a cambios en la

estructura de la pared del hongo, alteraciones mitocondriales o por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Dieryckx *et al.* 2015).

### **1.5 Resistencia mediada por ácido salicílico**

La resistencia sistémica adquirida (SAR) es el fenómeno por el cual tras una infección local se activan sistemas de defensa no específicos en otros puntos de la planta que todavía no han sido infectados. (Fu y Dong 2013).

El fenómeno de SAR está mediado por fitohormonas, fundamentalmente por SA. La respuesta de las plantas a las infecciones causadas por patógenos biotrófos es regulada por el SA mientras que la respuesta a patógenos necrótrofos es mediada por otra fitohormona, el ácido jasmónico (JA). A bajas concentraciones, ambas hormonas pueden actuar de forma sinérgica, activando ambas respuestas, pero a concentraciones mayores tienen funciones antagonistas. Otras hormonas como el etileno (ET) o el ácido abscísico (ABA) pueden modular la respuesta, pero no generan la respuesta de resistencia. En el caso del ET, este interviene en la regulación del “crosstalk” entre las dos hormonas principales, SA y JA (Pieterse *et al.* 2012).

Los PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), son compuestos de los patógenos (generalmente estructurales) que las células vegetales pueden detectar y, por tanto, sirven como señal para activar las defensas vegetales. Algunos patógenos han desarrollado compuestos que impiden la detección de los PAMPs, los efectores. Debido a fenómenos de co-evolución, algunas especies vegetales han desarrollado sistemas para reconocer estos efectores y poder activar sus defensas. La síntesis de SA se produce como consecuencia del reconocimiento de un PAMP (la inmunidad activada por PAMPs (PTI)) o de un efector (inmunidad activada por efectores (ETI)) (Pieterse *et al.* 2012).

Una vez se comienza a producir SA, la proteína “non-expressor of PR gene1” (NPR1) citoplasmática, es la que desencadena la señalización. Esta proteína se encarga de la activación de los genes PR (Pathogenesis-related), entre los cuales, el mejor conocido es el PR-1. NPR1 se expresa constitutivamente. Mientras no se produce la síntesis de SA, la mayor parte de NPR1 se encuentra en el citoplasma como un oligómero. Si en estas circunstancias llegara alguna molécula de NPR1 al núcleo, sería ubiquitinada y eliminada, antes de activar los genes PR. La síntesis de ácido salicílico genera variaciones en el potencial redox de la célula, lo que provoca la formación de monómeros de NPR1, en un proceso mediado por las tioredoxinas TRX-H3 y TRX-H5. Estos monómeros migran al núcleo, donde interactúan con factores transcripcionales de la familia TGA, que permiten que los genes PR se expresen (Pieterse *et al.* 2012).

Otros estudios (Fu *et al.* 2012) proponen dos receptores diferentes como receptores de ácido salicílico, las proteínas NPR3 y NPR4. Estas proteínas funcionarían a modo de adaptador para CUL3 E3 ligasa, que se encarga de la ubiquitinización de la proteína NPR1. NPR4 presenta una mayor afinidad por el SA, aunque realiza su función en ausencia de SA. Esto permite controlar los niveles de NPR1 para evitar activar los genes de defensa de forma innecesaria. NPR3 tiene menor afinidad por el SA. Este mecanismo controla la muerte celular programada, ya que un mecanismo de activación está controlado por un represor-NPC1, eliminando las células que han sufrido la lesión. El resto de

tejidos, que no han sufrido la lesión, presentarán niveles no tan altos de ácido salicílico. Estos niveles interrumpen la interacción NPR4-NPR-1, pero no son suficientemente altos como para permitir la formación del complejo NPR3-NPR1. Este fenómeno permitiría que NPR1 indujera la expresión de los genes que regulan el SAR sin que se produzca la muerte celular programada (Fu *et al.* 2012; Veloso *et al.* 2013).

## 2. Objetivos

En este trabajo nos centramos en estudiar los siguientes aspectos:

1. Determinar si el ácido salicílico posee propiedades fungicidas *in vitro* sobre *Phytophthora capsici* y *Botrytis cinerea*.
2. En caso de que tenga propiedades fungicidas, determinar si en planta se producen los mismos efectos, o solo genera resistencia sistémica adquirida.

## 3. Material y métodos

### 3.1 Material fúngico

Para los ensayos en placa se utilizaron dos hongos diferentes. Uno de ellos es *Botrytis cinerea*, cepa B0510 proporcionada por el Dr. J.A.L. van Kan (WUR, Países Bajos). El otro hongo fue *Phytophthora capsici*, cepa PC450 proporcionada por Franck Panabières (UMR INRA, Francia). Ambos hongos fueron incubados en un medio PDA (Potato Dextrose Agar), durante 3 días antes de ser inoculados para los ensayos en placa, en condiciones constantes de oscuridad y temperatura de 28 °C.

Para los ensayos en planta solo utilizamos la cepa PC450 de *Phytophthora capsici*, incubándola en un medio PDA durante 5 días antes de ser inoculada en condiciones de oscuridad y temperatura de 28 °C.

### 3.2 Material vegetal

Para evaluar los efectos en planta se utilizaron plántulas de pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L. cv. Padrón). Las semillas fueron plantadas en un medio de vermiculita en solución nutritiva Hoagland y Arnon (1950). Las plantas se cultivaron durante 14 días en ciclos de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C. Transcurrido ese tiempo se seleccionaron las plantas más vigorosas. Estas se trasplantaron a un medio compuesto por tierra y perlita en proporción 3:1 (v/v). Se mantuvieron en las mismas condiciones de luz y temperatura, regándose con agua del grifo.

### 3.3 Ensayo en placa

El modelo de ensayo en placa fue llevado a cabo en 2 experimentos independientes en el que de cada grupo se realizaron 3-4 réplicas.

Los ensayos en placas se realizaron utilizando un medio PDA, con las diferentes concentraciones de ácido salicílico. Se utiliza ácido salicílico en polvo, utilizando DMSO (dimetil sulfóxido) 0,5% como solvente. Se prepara un medio PDA con

diferentes concentraciones de ácido salicílico (0,1 mM, 0,3 mM, 0,6 mM, 1 mM). El control se prepara utilizando un medio PDA con DMSO 0,5%.

Las placas sembradas con *Phytophthora capsici* son selladas con parafilm, mientras que las de *Botrytis cinerea* no permanecen selladas, sino cerradas con celo, para permitir la aireación. Estas placas se mantienen en condiciones constantes de oscuridad y temperatura de 28 °C.

Tras 24 horas se toma la primera medida de crecimiento. Se siguen tomando medidas durante 72 horas, a intervalos de 24 horas.

### **3.4 Ensayo en planta**

El modelo de ensayo en planta fue llevado a cabo en 2 experimentos independientes, donde cada grupo contenía 5-6 plantas.

#### **3.4.1 Tratamiento**

Una semana y media después de trasplantar las plantas, se procedió al tratamiento de las mismas. Durante el ensayo, las plantas se dividieron en tres grupos, de seis plantas cada uno: control, ácido salicílico 0,1mM y ácido salicílico 1mM.

Las mezclas para el ensayo se prepararon a partir de ácido salicílico en polvo y utilizando DMSO 0,5% como solvente. A cada preparación se le añadió tampón fosfato 0,5 M pH 7 en la misma proporción que la dilución madre de ácido salicílico, resultando en una concentración final de 2,5 mM de tampón fosfato. El control se preparó utilizando DMSO y tampón fosfato en las concentraciones indicadas.

En cada planta se seleccionaron las dos primeras hojas verdaderas. Una de ellas fue pulverizada con 10 ml de la solución correspondiente, para determinar si se producía protección local. La otra hoja no se pulverizó y se analizó para determinar si se generaba una resistencia sistémica.

#### **3.4.2 Inoculación**

Tras 24 horas desde que se aplicaron los tratamientos de ácido salicílico se procedió a la inoculación de *Phytophthora capsici*. El inóculo se realizó utilizando discos cilíndricos de 5 mm de diámetro de un cultivo en PDA. En cada una de las hojas se colocaron 2 discos. Una vez realizada la inoculación, cada grupo de plantas fue separado en cajas independientes de plástico transparente. Estas cajas presentaban una elevada humedad ambiental para favorecer el crecimiento del hongo. Se incubaron en cámara, en ciclos de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C.

### 3.4.3 Evaluación de síntomas

La toma de datos llevó a cabo 48 horas después de la inoculación. Los síntomas fueron evaluados siguiendo una clasificación de 5 valores de severidad (Tabla 1).

Tabla 1. Escala de severidad utilizada para determinar la amplitud de los síntomas de *P. capsici*.

Severidad 0	Lesiones ausentes
Severidad 1	Síntomas presentes entre el 1% y el 25% de la superficie de la hoja
Severidad 2	Síntomas presentes entre el 26% y el 50% de la superficie de la hoja
Severidad 3	Síntomas presentes entre el 51% y el 75% de la superficie de la hoja
Severidad 4	Síntomas presentes entre el 76% y el 100% de la superficie de la hoja

### 3.5 Análisis de datos

El análisis de datos fue realizado utilizando el programa R x64 V.3.4.0. Para comprobar si existen diferencias entre los diferentes tratamientos en placa se realizó una prueba Kruskal-Wallis y posteriormente un test de Dunn ( $\alpha=0,05$ ) para detectar diferencias entre los distintos tratamientos. Para determinar los efectos del ácido salicílico en planta se realizó un test  $\chi^2$  Pearson ( $\alpha=0,05$ ) y así comprobar si puede generar una resistencia local o sistémica.

Para determinar la ED50, se realiza una gráfica que enfrente el porcentaje de inhibición del crecimiento frente al logaritmo de la concentración de ácido salicílico en  $\mu\text{M}$ . Se calcula la recta de regresión que mejor ajuste los datos y se extrapolan los datos de la ED50 (inhibición del crecimiento del 50%).

## 4. Resultados

### 4.1 Resultados: ensayos en placa

#### 4.1.1 *Botrytis cinerea*

El ácido salicílico no generó una gran inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea*, aunque a concentraciones elevadas se observa con claridad (Figura 8).

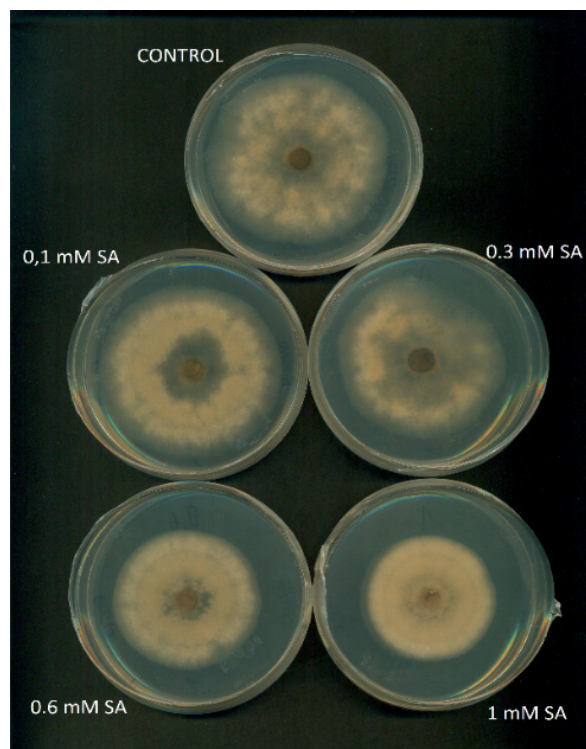


Figura 8. Placas con *Botrytis cinerea* tras 72 horas de incubación a diferentes concentraciones de ácido salicílico.

Comparando el efecto de los distintos tratamientos a intervalos de 24 horas, mediante el test Kruskal-Wallis, existe diferencia entre los diferentes tratamientos a 48 y 72 horas ( $p=0,0002637$ ;  $0,0004573$  respectivamente) aunque no se puede afirmar que a las 24 horas existan diferencias significativas ( $p=0,08888$ ) (Figura 9).

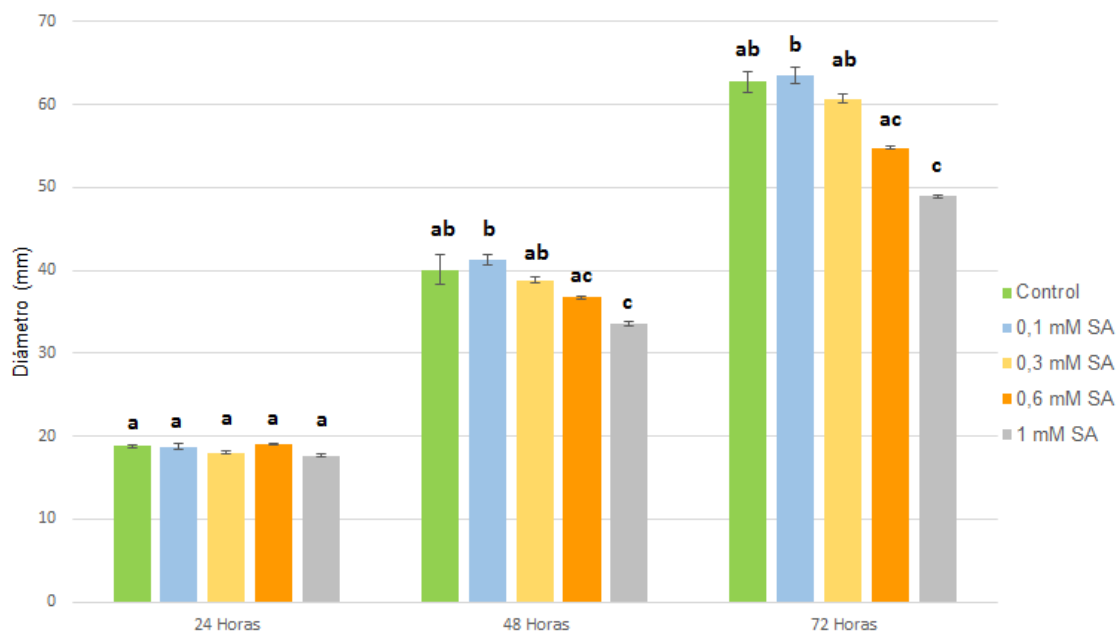


Figura 9. Diámetro de colonias de *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones de ácido salicílico (SA). Los datos son las medias  $\pm$  el error estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).



Tras 48 horas de tratamiento, mediante el test de Dunn, podemos determinar que el tratamiento de 1 mM SA difiere significativamente de los tratamientos de 0,1 mM SA, 0,3 mM SA y el control ( $p=0,00038$ ;  $0,0097$ ;  $0,0042$  respectivamente), pero no del tratamiento de 0,6 mM SA. El tratamiento de 0,6 mM difiere significativamente del tratamiento de 0,1 mM SA ( $p=0,04294$ ) (Figura 9).

Tras 72 horas de tratamiento, mediante el test de Dunn, podemos determinar que el tratamiento de 1 mM SA difiere de los tratamientos de 0,1 mM SA, 0,3 mM SA y el control ( $p=0,00079$ ;  $0,0059$ ;  $0,0052$  respectivamente), aunque no del tratamiento de 0,6 mM SA (Figura 9).

Dado que el grado de inhibición no alcanza el 50% a las concentraciones que fueron ensayadas, no es posible calcular la ED50.

#### 4.1.2 *Phytophthora capsici*

El ácido salicílico causó una importante inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici*, especialmente a concentraciones elevadas donde el crecimiento fue mínimo (Figura 10).

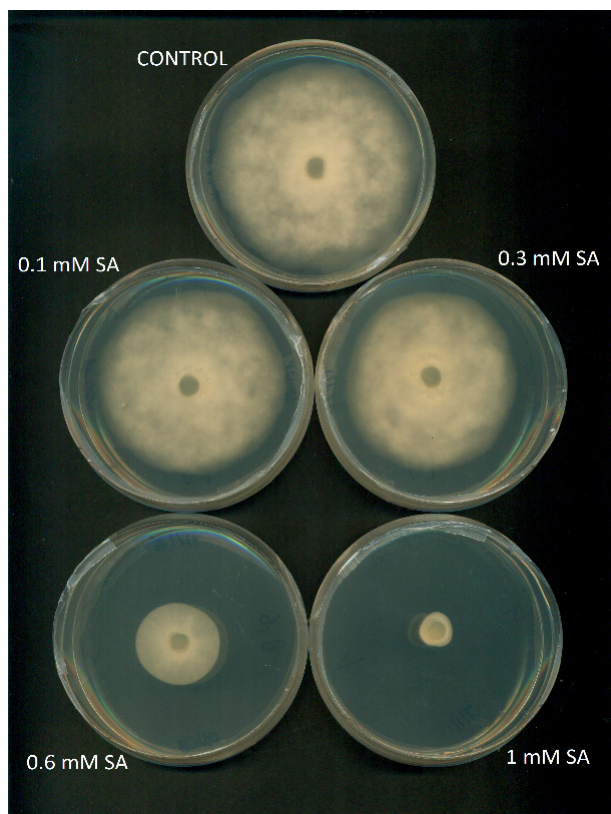


Figura 10. Placas con *Phytophthora capsici* tras 72 horas de incubación a diferentes concentraciones de ácido salicílico.

Comparando el efecto de los distintos tratamientos a intervalos de 24 horas, mediante el test Kruskal-Wallis, se puede afirmar que existe diferencia entre los

diferentes tratamientos a 24, 48 y 72 horas ( $p=1,03 \times 10^{-5}$ ;  $6,22 \times 10^{-6}$ ;  $4,68 \times 10^{-5}$  respectivamente) (Figura 11).

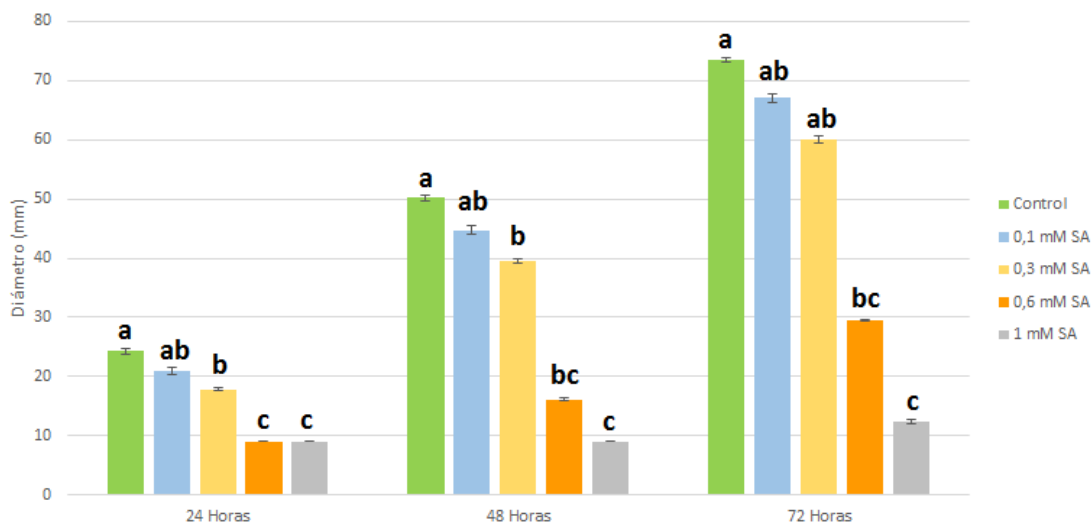


Figura 11. Diámetro de colonias de *Phytophthora capsici* a diferentes concentraciones de ácido salicílico (SA). Los datos son las medias  $\pm$  el error estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0,05$ ).

Tras 24 horas de tratamiento, mediante el test de Dunn, podemos determinar que existen diferencias entre el tratamiento control y los tratamientos de 0,3 mM SA, 0,6 mM SA y de 1 mM SA ( $p=4,95 \times 10^{-2}$ ;  $8,35 \times 10^{-4}$ ;  $4,02 \times 10^{-5}$  respectivamente). El tratamiento con 0,1 mM SA difiere significativamente de los tratamientos de 0,6 mM SA y de 1 mM SA ( $p=1,97 \times 10^{-2}$ ;  $5,04 \times 10^{-3}$  respectivamente) (Figura 11).

Tras 48 horas de tratamiento, mediante el test de Dunn, podemos determinar que existen diferencias entre el tratamiento control y los tratamientos de 0,3 mM SA, 0,6 mM SA y de 1 mM SA ( $p=3,11 \times 10^{-2}$ ;  $5,92 \times 10^{-3}$ ;  $3,82 \times 10^{-6}$  respectivamente). El tratamiento de 1 mM SA, además del tratamiento control, difiere de los tratamientos de 0,1 mM SA y 0,3 mM SA ( $p=2,91 \times 10^{-3}$ ;  $3,22 \times 10^{-2}$  respectivamente) (Figura 11).

Tras 72 horas de tratamiento, mediante el test de Dunn, podemos determinar que el tratamiento control difiere del tratamiento de 0,6 mM SA y 1 mM SA ( $p=0,0183$ ;  $0,000022$  respectivamente). El tratamiento de 1 mM SA, además del tratamiento control, difiere de los tratamientos de 0,1 mM SA y 0,3 mM SA ( $p=0,0109$ ;  $0,0087$  respectivamente) (Figura 11). Se da una importante reducción del crecimiento de *P. capsici* sobre todo a partir de 0.6 mM,

La ED50 se interpoló linealmente los datos de inhibición de crecimiento (Figura 12). Este cálculo solo pudo realizarse para *P. capsici*, ya que *B. cinerea* no redujo lo suficiente su crecimiento a las concentraciones de SA ensayadas. Se calculó la recta de regresión que se ajusta a los datos de *P. capsici*, dando como resultado:

$$\% \text{ Inhibición} = 78,077 \times \text{Log} [\text{SA}] (\mu\text{M}) - 157,88$$

El resultado obtenido para la ED50 fue de 459,72  $\mu\text{M}$  SA (0,45972 mM SA).

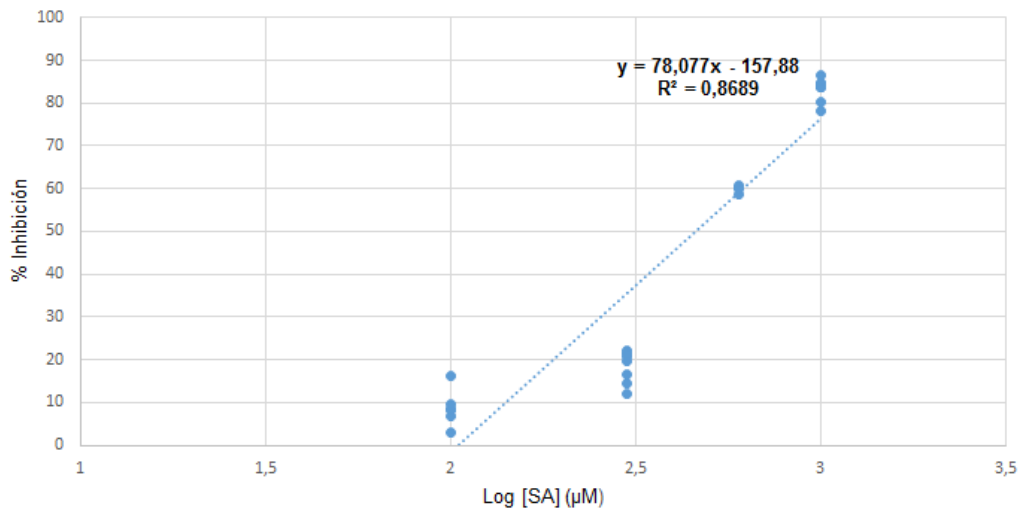


Figura 12. Recta de regresión utilizada para calcular la ED50 de ácido salicílico frente a *Phytophthora capsici*.

## 4.2 Resultados: ensayos en planta

### 4.2.1 Protección local

El resultado del test  $\chi^2$  Pearson permite determinar que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con ácido salicílico y el control, con un p-valor de 0,9149 (Figura 13). Las hojas pulverizadas con ambos tratamientos (0,1 y 1 mM SA), no mostraron la reducción de la infección por *P.capsici*, al contrario que los tratamientos en placa donde la inhibición fue fuerte (más de un 85% del crecimiento para 1 mM). Se esperaría que el efecto tóxico paliara la infección.

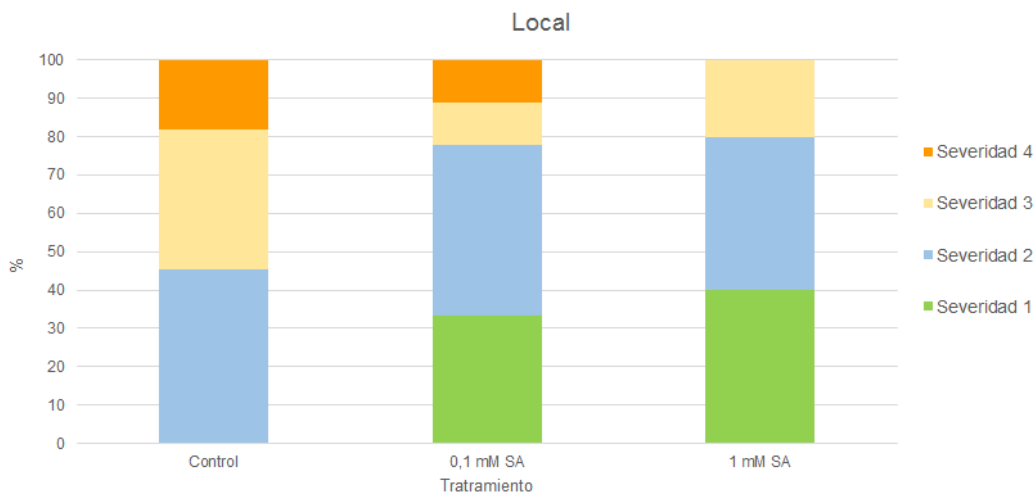


Figura 13. Proporción de severidad de los síntomas en las hojas utilizadas para determinar protección local en los diferentes tratamientos.

### 4.2.2 Resistencia sistémica

El resultado del test  $\chi^2$  Pearson permite determinar que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con ácido salicílico y el control, con un p-valor de 0,459 (Figura 14). Este resultado no es tan inesperado como el anterior. Estas hojas no fueron pulverizadas con SA por lo que no hay un contacto directo del patógeno con el SA en la superficie de la hoja.

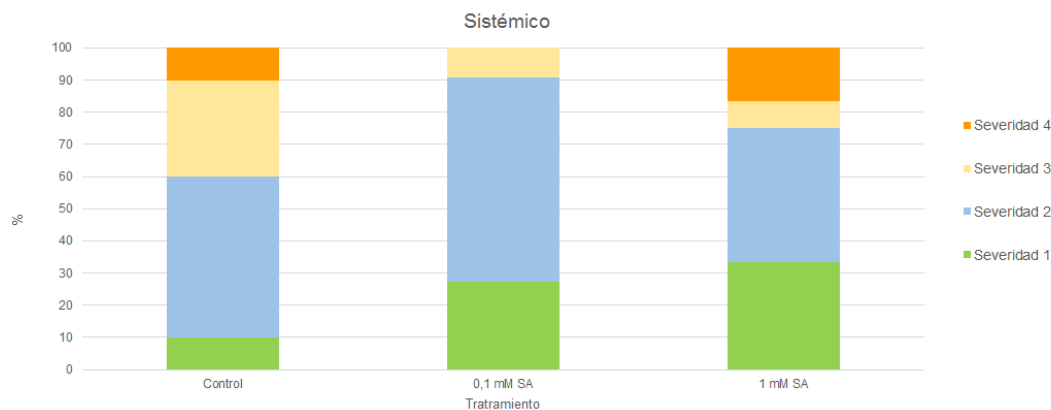


Figura 14. Proporción de severidad de los síntomas en las hojas utilizadas para determinar resistencia sistémica en los diferentes tratamientos.

Destacar que igual que a nivel local la toxicidad del SA en la superficie de la hoja no parece ser efectiva, las respuestas de defensa de la planta activadas por SA no parecen efectivas en reducir la infección de *P. capsici*.

## 5. Discusión

Trabajos previos ya demostraron que el ácido salicílico puede presentar actividad fungicida. El trabajo de Amorabé *et al.* (2002) muestra inhibición del crecimiento del hongo *Eutypa lapa* Pers.Fr., al mismo tiempo que se observaban alteraciones morfológicas en los filamentos del micelio. En el estudio de Zabka y Pavela (2013) también se observa que el ácido salicílico tiene capacidad fungicida. Los hongos sobre los que trabajaron pertenecían a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Por otra parte, de todos los ácidos fenólicos analizados en ese estudio, el ácido salicílico fue el único que presentó capacidad inhibitoria.

Dieryckx *et al.* (2015) realizaron ensayos con *Botrytis cinerea* donde se observó inhibición del crecimiento en medios con SA y MeSA. La mínima concentración en la que detectaron inhibición fue de 2,5 mM utilizando SA y 0,38 mM con MeSA. En este trabajo la concentración más alta fue de 1 mM por lo que la ED50 no se pudo calcular. Este estudio no pretendía utilizar concentraciones elevadas de SA, ya que al realizar los ensayos en planta, la elevada concentración de SA podría dañar la planta. Nulton-Persson *et al.* (2004) determinaron algunos de los daños celulares que el SA puede causar, como son alteraciones en las mitocondrias causando alteraciones en la respiración celular o la inhibición del complejo  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDT) y la acumulación de aconitasa. Dieryckx *et al.* (2015) confirmaron la acumulación de aconitasa y de dihidroxipolipoil deshidrogenasa (el componente E3 de la KGDT) en los hongos tratados tanto con el SA como con el MeSA. Varias enzimas implicadas en la eliminación de especies reactivas de oxígeno no fueron tan abundantes al aplicar SA o MeSA, por lo que se produce una acumulación de  $H_2O_2$  que puede inhibir el crecimiento del hongo. Por último, la pared del hongo presentaba una menor cantidad de un efector de tipo cerato-platanina (CPP) al aplicar MeSA y SA. Esto

implicaría una respuesta más rápida de la planta frente al hongo, ya que cuando *Botrytis cinerea* es expuesta a materia vegetal, rápidamente se incrementa la presencia de este compuesto.

Este trabajo confirma las capacidades fungicidas del ácido salicílico, aunque con efectos diferentes en los hongos utilizados para los experimentos. *Botrytis cinerea* no muestra variación en el crecimiento entre tratamientos durante las primeras 24 horas de incubación. En las siguientes 48-72 horas solo los tratamientos con concentraciones más elevadas de ácido salicílico tienen efecto inhibitorio. Por el contrario, *Phytophthora capsici* presenta una reducción del crecimiento desde las primeras 24 horas de incubación, asimismo la concentración a la que el ácido salicílico actúa inhibiendo el crecimiento es menor (0,3 mM SA).

Las causas de estas diferencias no pueden ser establecidas con este trabajo, pero hay que considerar que se trata de especies evolutivamente muy distantes. Desde un punto de vista patogénico *Phytophthora capsici* es tratado como un hongo ya que tiene similitudes con los hongos como es la formación de hifas. No obstante, las similitudes con los hongos son el resultado de una convergencia evolutiva. Un ejemplo de estas diferencias son las membranas de los oomicetos que contienen estructuras diferentes y ácidos grasos de cadena larga, que aparecen en lugar de los esteroides (Veloso *et al.* 2014). De este modo las causas que inhiben el crecimiento en los dos patógenos estudiados no tienen por qué ser las mismas.

Únicamente en el caso de *Phytophthora capsici* fue posible determinar la ED50 (aproximadamente 0,46 mM SA). El metalaxyl fue durante bastante tiempo el fungicida comercial más utilizado para combatir las infecciones causadas por *Phytophthora capsici*. Posteriormente fue sustituido por el mefenoxan, que contiene un enantiómero más activo del metalaxyl. Desde 1997 se observa un descenso en la sensibilidad de ambos fungicidas frente al patógeno en numerosas cepas aisladas. La estimación de la ED50 de las cepas resistentes frente al mefenoxan es de 1,79 mM y aun es mayor el del metalaxyl, en torno a 2,51 mM (Parra y Ristaino 2001). Estos valores se deben a que el metalaxyl ha sido mucho más utilizado (Parra y Ristaino 2001). Dada la ED50 obtenida del SA (0,46 mM), las diferencias con los fungicidas comerciales no tienen una magnitud tan diferente, siendo incluso menor para el SA.

Trabajos anteriores en plantas de pimiento (Park *et al.* 2007) muestran una reducción en la severidad de las lesiones ocasionadas por *Phytophthora capsici* en tratamientos con 1,81 mM de ácido salicílico desarrollando resistencia sistémica. El mismo experimento fue realizado con salaceyin A, un derivado de ácido salicílico, observándose una ED50 de 1,71 mM sin que se desarrollase resistencia. Con anterioridad el salaceyin A ya había mostrado un incremento en la protección local a concentraciones inferiores. Otros estudios muestran un incremento de la resistencia generada al tratar plantas de pimiento con compuestos agonistas del ácido salicílico (Baysal *et al.* 2005), en este caso con Acibenzolar-S-metil (ASM). Después de 7 días desde la inoculación de

*Phytophthora capsici* la zona afectada se reduce hasta en un 45%, aunque los efectos son visibles desde el segundo día. Tras la aplicación de ASM se incrementa la actividad de PAL y la acumulación de fenoles. Sin embargo, otros estudios como (Núñez-Pastrana *et al.* 2011) no obtuvieron resultados de aumento de protección al aplicar ácido salicílico a plántulas *in vitro*. Núñez-Pastrana *et al.* (2011) utilizaron *Capsicum chinense* en sus ensayos, pero observaron el mismo resultado, el SA no produjo protección de la planta frente a *P.capsici*. Sin embargo, en el mismo trabajo se describe como el etileno, otra de las importantes fitohormonas implicadas en la defensa si produjo una reducción de la infección. Curiosamente, el mecanismo que se desencadenó por el tratamiento de etileno es similar al producido por SA pero de una manera independiente del NPR1. En este trabajo el etileno tuvo un efecto tóxico tanto *in vitro* como en planta, que los autores consideran responsable, al menos en parte, del efecto protector.

Nuestros resultados no muestran que el ácido salicílico genere protección local o sistémica frente a *Phytophthora capsici* en planta de pimiento. Hay que tener en cuenta que el tamaño muestral utilizado es reducido, por lo que no se descartaría que pudiese tener capacidad de generar algún tipo de resistencia, como en estudios previos.

## 6. Conclusiones

1. El ácido salicílico muestra un fuerte efecto inhibitorio del crecimiento de *Phytophthora capsici in vitro*, pero muy leve sobre *Botrytis cinerea*.
2. En los tratamientos en planta, el ácido salicílico no causó protección local ni sistémica frente a *Phytophthora capsici*.

## 6. Conclusiões

1. O ácido salicílico amosa un forte efecto inhibitorio do crecemento de *Phytophthora capsici.in vitro*, pero moi leve sobre *Botrytis cinerea*.
2. Nos tratamentos en pranta, o ácido salicílico non causou protección local nin sistémica fronte a *Phytophthora capsici*.

## 6. Conclusions

1. Salicylic acid shows a strong inhibitory effect of the growth of *Phytophthora capsici in vitro*, but very mild on *Botrytis cinerea*.
2. In plant treatments, salicylic acid did not show any local or systemic protection against *Phytophthora capsici*.



## 7. Bibliografía

Amborabé B., Fleurat-Lessard P. y Chollet J. (2002). *Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards Eutypa lata: structure-activity relationship*. Plant Physiology and Biochemistry, 40, 1051-1060.

Baysal, Ö., Turgut, C. y Mao, G. (2005). Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. *Biologia Plantarum*, 49, 599–604.

Dieryckx C., Gaudin V., Dupuy J., Bonneau M., Girard V. y Job D. (2015). *Beyond plant defense: insights on the potential of salicylic and methylsalicylic acid to contain growth of the phytopathogen Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 859.

Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2017). *FAOSTAT*. [En línea] <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> [Consulta: 10 de Mayo de 2017].

Food & Agriculture Organizations of the United Nations (FAO) (2002). *El cultivo protegido en clima mediterráneo*. Estudio FAO: Producción y protección vegetal, 90, pp.202-204.

Fu Z. y Dong X. (2013). *Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense*. *The Annual Review of Plant Biology*, 64, 839-63

Fu Z., Yan S., Saleh A., Wang W., Ruble J., Oka N., Mohan R., Spoel S., Tada Y., Zheng N. y Dong X. (2012). *NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants*. *Nature*, 486, 228-232.

Hausbeck, M. y Lamour K. (2004). *Phytophthora capsici on vegetable crops: Research progress and management challenges*. *Plant Disease*, 88, 1292-1303.

Hoagland D. y Arnon D. (1950). *The water-culture method for growing plants without soil*. California Agricultural Experiment Station Circular, 347, 1-32.

Lamour K., Stam R., Jupe J. y Huitema E. (2012). *The oomycete broad-host-range pathogen Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13, 329-337.

Latorre B., Elfar K. y Ferrada E. (2015) *Gray mold caused by Botrytis cinerea limits grape production in Chile*. *Ciencia e Investigación Agraria*, 42, 305-330.

Nulton-Persson A., Szweda L. y Sadek H. (2004) *Inhibition of cardiac mitochondrial respiration by salicylic acid and acetylsalicylate*. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 44, 591-595.

Núñez-Pastrana, R., Arcos-Ortega, G.F., Souza-Perera, R.A., Sánchez-Borges, C.A., Nakazawa-Ueji, Y.E., García-Villalobos, J., Guzmán-Antonio, A., y Zúñiga-Aguilar, J. (2011). Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper. *European Journal of Plant Pathology*, 131, 669–683.

Park C., Lee D., Kim W., Ahn J. y Kim B. (2007). *Antifungal activity of salaceyin A against Colletotrichum orbiculare and Phytophthora capsici*. Journal of Basic Microbiology, 47, 332-339.

Parra G. y Ristaino J. (2001). *Resistance to Mefenoxam and Metalaxyl among field isolates of Phytophthora capsici causing phytophthora blight of bell pepper*. Plant Disease, 85, 1069-1075.

Pieterse C., Van der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A. y Van Wees S. (2012). *Hormonal Modulation of Plant Immunity*. The Annual Review of Cell and Developmental Biology, 28, 489-497.

Pomar F., Bernal M., Collar J., Díaz J., Caramelo C., Gayoso C., Novo M., Prego C., Saavedra A., Silvar C. y Merino F. (2001). *A survey of "tristeza" of pepper in Galicia and the fungal pathogens causing the disease*. Capsicum & Eggplant Newsletter, 20, 90-93.

Sendon P., Seo H. y Song J. (2011). *Salicylic acid signalling: biosynthesis, metabolism and crosstalk with jasmonic acid*. Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry, 54, 501-506.

Van Kan J. (2006). *Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen*. Trends in Plant Science, 5, 247-253.

Veloso J., García T., Bernal A. y Díaz J. (2013). *New bricks on the wall of induced resistance: salicylic acid receptors and transgenerational priming*. European Journal of Plant Pathology, 138, 685-693.

Veloso J., Prego C., Varela M., Carballeira R., Bernal A., Merino F. y Díaz J. (2014). *Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper*. Plant Biology, 16, 177-185.

Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. y Van Kan J. (2007). *Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease*. Molecular Plant Pathology, 8, 561-580.

Zabka M. y Pavela R. (2013) *Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxicogenic filamentous fungi*. Chemosphere, 93, 1051-1056.