

# Grado en Biología

## Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Propiedades de un producto fitosanitario comercial con pirimetanil frente a *Botrytis cinerea* en judía**

**Propiedades dun produto fitosanitario comercial con pirimetanil fronte a *Botrytis cinerea* en feixón**

**Properties of a commercial phytosanitary product with pyrimethanil against *Botrytis cinerea* in bean**



**David Núñez Lema**

Junio, 2019

*Directores Académicos: José Díaz Varela y Néstor Carrillo Barral*





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.

“Propiedades de un producto fitosanitario comercial con pirimetanil frente a *Botrytis cinerea* en judía”

“Propiedades dun produto fitosanitario comercial con pirimetanil fronte a *Botrytis cinerea* en feixón”

“Properties of a commercial phytosanitary product with pyrimethanil against *Botrytis cinerea* in bean”

David Núñez Lema.

Dr. José Díaz Varela y Dr. Néstor Carrillo Barral, en calidad de tutores de este trabajo autorizan su presentación ante el tribunal evaluador.

A Coruña, Junio de 2019.

José Díaz Varela

Néstor Carrillo Barral



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
Palabras clave.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. <i>Botrytis cinerea</i> .....	3
1.2. Pirimetanil.....	5
1.3 <i>Phaseolus vulgaris</i> . ....	6
1.4. Resistencia inducida. ....	7
1.5. Papel de los polifenoles en la defensa de la planta .....	9
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
3.1 Material vegetal.....	9
3.2. Material fúngico.....	10
3.3. Tratamiento con pirimetanil.....	10
3.4. Inoculación y síntomas.....	10
3.5. Determinación del contenido de fenoles solubles totales.....	10
3.5.1. Obtención de las muestras vegetales.....	10
3.5.2. Extracción de fenoles. ....	11
3.5.3. Medida de los fenoles. ....	11
3.6. Estadística.....	11
4. RESULTADOS.....	11
4.1. Ensayos de severidad.....	11
4.2. Medida de fenoles totales.....	13
5. DISCUSIÓN.....	13
6. CONCLUSIONES.....	15
6.1. Castellano.....	15
6.2. Galego.....	16
6.3. English.....	16
7. BIBLIOGRAFÍA.....	17



## RESUMEN

*Botrytis cinerea* es un hongo fitopatógeno necrótrofo que afecta a un número muy amplio de especies de interés económico para el ser humano. Debido a que se trata de un hongo con gran capacidad para desarrollar resistencia contra productos fitosanitarios es importante buscar nuevas técnicas y productos para controlarlo. En el presente trabajo se ha pretendido evaluar la capacidad de un producto fitosanitario con pirimetanil para proteger a la planta de la judía (*Phaseolus vulgaris*) contra este hongo patógeno, ya que, además de tener una capacidad fungicida conocida, hay indicios que sugieren que también podría ser un agente inductor de resistencia. Los resultados obtenidos muestran que el pirimetanil produce una reducción significativa de la expansión de las lesiones a nivel local, lo que confirma su capacidad fungicida. Asimismo se ha observado una reducción significativa de la expansión de las lesiones a nivel sistémico, lo que sugiere que el pirimetanil ha provocado la inducción de las defensas de la planta. Por último, se ha tratado de determinar si el tratamiento con pirimetanil sobre la planta provoca un cambio en el contenido de fenoles. No obstante, no se ha observado una variación significativa del contenido de estos compuestos.

## RESUMO

*Botrytis cinerea* é un fungo fitopatóxeno necrótrofo que afecta a un número moi amplo de especies de interese económico para o ser humano. Debido a que se trata dun fungo con gran capacidade para desenrolar resistencia contra produtos fitosanitarios é importante buscar novas técnicas e produtos para controlalo. No presente traballo pretendeuse avaliar a capacidade dun produto fitosanitario con pirimetanil para protexer á planta do feixón (*Phaseolus vulgaris*) contra este fungo patóxeno, xa que, ademáis de ter unha actividade funguicida coñecida, hai indicios que suxiren que tamén podería ser un axente inductor de resistencia. Os resultados obtidos mostran que o pirimetanil produce unha redución significativa da expansión das lesións a nivel local, o que confirma a súa capacidade funguicida. Do mesmo xeito observouse unha redución significativa da expansión das lesións a nivel sistémico, o que suxire que que o pirimetanil provocou a indución das defensas da planta. Por último, tratouse de determinar se o tratamento con pirimetanil sobre a planta provoca un cambio no contido de fenoles. Non obstante, non se observou unha variación significativa do contido destes compostos.

## ABSTRACT

*Botrytis cinerea* is a necrotrophic phytopathogenic fungus which affects a very large number of species of economic interest for humans. Because it is a fungus with great capacity to develop resistance against phytosanitary products it is important to look for new techniques and products to control it. The present work has tried to evaluate the capacity of a phytosanitary product containing pyrimethanil to protect the bean plant (*Phaseolus vulgaris*) against this pathogenic fungus. In addition to having a known fungicidal capacity, there are indications that pyrimethanil could also be a resistance inducing agent. The results obtained show that pyrimethanil produces a significant reduction in the expansion of the lesions at the local level, which confirms its fungicidal capacity. Likewise, a significant reduction in the expansion of the

lesions at the systemic level has been observed, which suggests that pyrimethanil has caused the induction of plant defenses. Finally, the present work tried to determine if the treatment with pyrimethanil on the plant causes a change in the content of phenols. However, no significant variations in the content of these compounds have been observed.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris*, *Botrytis cinerea*, resistencia inducida, fenoles, pirimetanil.

# 1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es una actividad de gran importancia para el ser humano, considerada como una de las bases de la civilización. Por ello, es interesante sacar el máximo rendimiento de los cultivos, y una de las formas de hacer esto es protegiéndolos de las diversas enfermedades fitosanitarias que existen. Estas enfermedades son un problema grave ya que causan pérdidas económicas masivas (Amselem *et al.*, 2011; Rosslenbroich & Stuebler, 2000). Si bien resulta imposible evitarlas por completo, sí que se puede reducir su impacto o incluso prevenir en muchas ocasiones la infección mediante el uso de estrategias como la aplicación de pesticidas, el control biológico, o el uso de elicitores (Lamberth, 2012). En este trabajo se evaluará la capacidad del pirimetanil, un producto fitosanitario, para proteger a la planta de la judía contra un hongo infeccioso.

## 1.1. *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinerea* Pers: Fr., también conocido como *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel en su forma telomórfica, es el hongo causante de la podredumbre gris. Esta enfermedad afecta a más de 1000 especies de plantas en todo el mundo, incluyendo cultivos muy importantes (como la vid, la fresa, y judía) durante su crecimiento y mientras están almacenados, causando unas pérdidas económicas que superan los 1000 millones de euros al año (Rosslenbroich & Stuebler, 2000; Veloso *et al.*, 2018). A esto se añade que este hongo tiene distintas formas de atacar a las plantas, por lo que es necesario combatirlo con varios métodos de control simultáneamente, y además ha demostrado ser capaz de desarrollar resistencia a más de un fitosanitario cuando se utiliza de forma abusiva (Williamson *et al.*, 2007). El estudio de este hongo es de gran importancia debido al interés que existe en encontrar formas eficientes para combatirlo.

*Botrytis cinerea* es un patógeno especializado en plantas dicotiledóneas, aunque también ataca a algunas monocotiledóneas, y puede afectar a varios órganos de la planta como hojas, tallos, flores, etc. Su estrategia, a grandes rasgos, consiste en alimentarse del tejido vegetal muerto que el propio hongo descompone, siendo los tejidos senescentes de la planta las partes más vulnerables a la infección, aunque tiene una fase inicial en la que mantiene las células vegetales vivas para permitir el desarrollo de la infección (Williamson *et al.*, 2007). Es decir, tiene una fase inicial biótrofa, y otra necrótrofa, lo que ha llevado a considerarlo un hongo hemibiótrofo (Veloso *et al.*, 2018).

Generalmente, el ciclo de vida es el siguiente: las semillas son infectadas por las esporas, aunque puede haber infección en cualquier fase del ciclo de crecimiento de la planta, el micelio o los conidios crecen durante largos períodos de tiempo (semanas o incluso meses) y, cuando llega el momento de la floración, el modo de vida del hongo se vuelve más agresivo, produciendo esporas y reiniciando el ciclo (van Kan *et al.*, 2014).



Figura 1. Conidióforo de *Botrytis cinerea* (Wikipedia, 2019)

Para infectar una planta, el hongo desarrolla unas estructuras achatadas denominadas apresorios, que se diferencian en la superficie de las células de la planta y posteriormente forman una hifa de penetración que atraviesa la cutícula. Para hacer esto, *Botrytis* no es capaz de atravesar la cutícula por tan sólo fuerza mecánica, por lo que necesita segregar enzimas hidrolíticas como cutinasas y lipasas, así como otras enzimas necesarias para la penetración del hongo, de las cuales destacan la proteína asociada a la membrana BcPLS1 y la superóxido dismutasa BcSOD1 (Amselem *et al.*, 2011; Govrin & Levine, 2000). La hifa de penetración secreta también peróxido de hidrógeno para proporcionar un sustrato para las oxidasas. Una vez atravesada la cutícula, el micelio crecerá en la pared anticlinal de las células de la planta, rica en pectinas que el hongo degrada mediante la secreción de pectinasas (Williamson *et al.*, 2007).

Como hongo necrotrofo, el objetivo de *Botrytis* es matar a las células de las plantas que infecta para poder alimentarse de ellas. Para hacer esto se vale de diversos métodos: el uso de metabolitos fitotóxicos, estallidos oxidativos, ácido oxálico o toxinas selectivas, entre otros métodos (Choquer *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2007).

Los síntomas que causa esta enfermedad son muy variables en las distintas plantas y los diferentes órganos. Entre los más generales tenemos la podredumbre blanda, acompañada del colapso de los tejidos parenquimáticos y la aparición de masas grises en las hojas y los frutos (Williamson *et al.*, 2007).



Figura 2. Podredumbre gris en hojas de judía.

*Botrytis cinerea* ha sido tratado tradicionalmente con diversos tipos de pesticidas de acción específica, pero el hongo no ha tardado mucho en desarrollar resistencia, sobre todo en los casos en los que se ha abusado del producto en cuestión, resultando en una disminución de la efectividad de los tratamientos. La forma más notable que tienen los hongos de desarrollar resistencia es mediante la modificación de las dianas de los fungicidas, al modificar los genes que las codifican. Por esta razón, es muy importante la búsqueda de nuevos métodos para controlar eficientemente esta enfermedad y reducir todo lo posible las pérdidas económicas que pueda causar (Hahn, 2014).

## 1.2. Pirimetanil

El pirimetanil es un fungicida perteneciente al grupo de las anilinopirimidinas, las cuales fueron introducidas en los 90 y son conocidas por actuar sobre distintos hongos del filo Ascomycete. Los ejemplos más característicos de anilinopirimidinas son el mepanipirim, el cipronidil y el pirimetanil (Hahn, 2014; Lamberth, 2012).

Las anilinopirimidinas son moléculas formadas por la unión de una anilina con una pirimidina que contenga un grupo saliente en la posición 2, o bien por la ciclocondensación de una arilguanidina con el  $\beta$ -dicetona adecuado (Walters *et al.*, 2013)

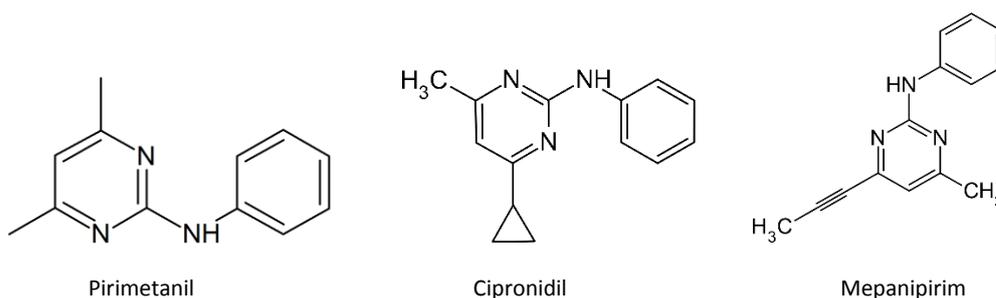


Figura 3. Anilino pirimidinas más características (Wikipedia 2018)

Las anilinopirimidinas son conocidas por tener un gran efecto preventivo en distintas enfermedades de plantas causadas por hongos. Destacan por la inhibición de la elongación del tubo germinativo durante la geminación, la formación del apresorio y el crecimiento micelial, a nivel local primero y sistémico después. Su principal modo de acción es la inhibición de la síntesis de metionina, aunque también inhiben enzimas de degradación de la pared celular vegetal como pectinasas, celulasas, lipasas y proteasas. (Lamberth, 2012).

En este Trabajo de Fin de Grado se ha utilizado el pirimetanil (Scala, perteneciente a la compañía Bayer) para comprobar sus propiedades fitosanitarias contra *Botrytis cinerea*.



Figura 4. Scala, producto fitosanitario a base de pirimetanil (Bayer)

La actividad fungicida del pirimetanil es especialmente efectiva contra los hongos del grupo *Botrytis* (Lamberth, 2012). No obstante, el motivo por el cual se ha seleccionado para este estudio es que también se ha observado que podría ser utilizado como elicitador, estimulando las defensas de las plantas. En un experimento con la planta de la vid (*Vitis vinifera*), el tratamiento con pirimetanil incrementó el contenido de polifenoles totales, aumentó la cuantificación de quercetin-3-O glucurónido (Q3OG) en las hojas de la planta y moduló varios genes defensivos, lo que llevó a los investigadores a creer que podría estar induciendo resistencia. No obstante existen ciertas dudas, ya que la propia actividad fungicida provoca la liberación de PAMPs (“Pathogen-Associated Molecular Patterns”), que pueden ser detectadas por los receptores de la planta e inducir un tipo resistencia conocida como PTI (“PAMP Triggered Immunity”; Bellée *et al.*, 2018; Denancé *et al.*, 2013).

### 1.3. *Phaseolus vulgaris*

La judía, o *Phaseolus vulgaris*, es una de las especies de legumbres más importantes para el ser humano, debido a que su producción y consumo están muy extendidos por todo el mundo. Es también, al igual que otros muchos cultivos, una especie bastante vulnerable a infecciones como la podredumbre gris.



Figura 5. *Phaseolus vulgaris* (Wikipedia, 2019)

La producción mundial de judía se ha incrementado hasta acercarse a los 25 millones de toneladas en todo el mundo, siendo China el productor más importante, (19 millones de toneladas producidas en 2017), seguida por Indonesia e India (915 y 675 mil toneladas respectivamente; FAOSTAT, 2019)

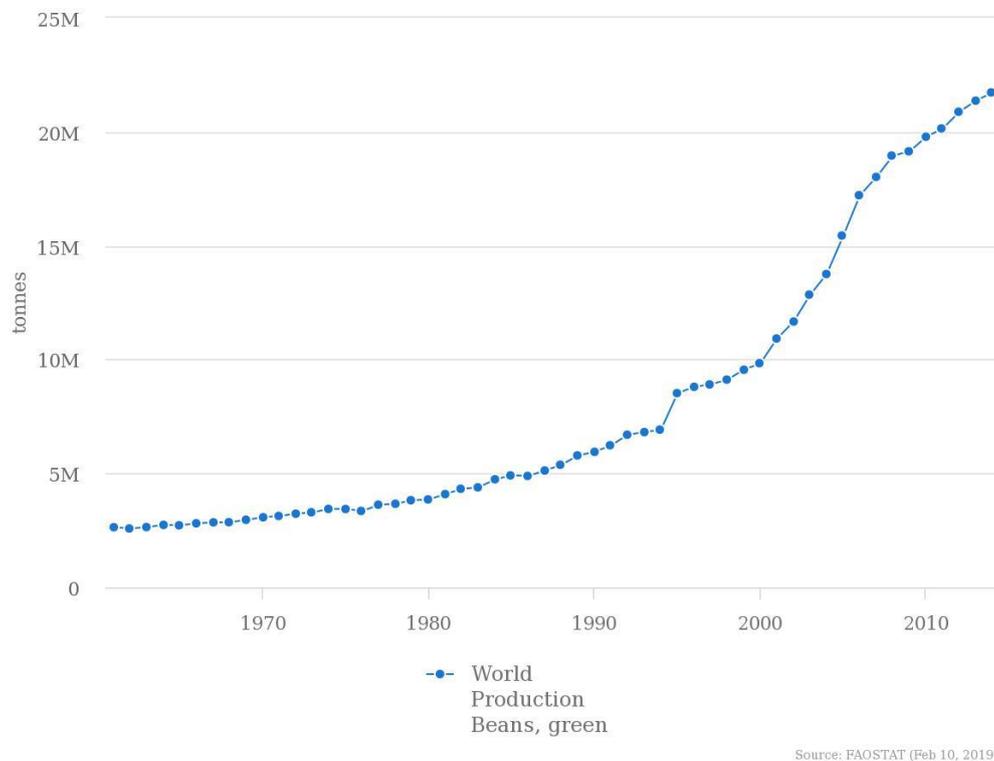


Figura 6. Incremento de la producción mundial de judía entre 1965 y 2015 (FAOSTAT, 2019).

Debido a su importancia económica y alimentaria, a su susceptibilidad a *Botrytis*, a su rápido crecimiento y el tamaño de sus hojas, *Phaseolus vulgaris* es la especie que se ha utilizado en el presente trabajo.

#### 1.4. Resistencia inducida

La resistencia inducida consiste en la activación de una respuesta defensiva generalizada en la planta como respuesta a la presencia de patógenos en sus tejidos o bien por la presencia de ciertos compuestos químicos. Dichos compuestos se pueden aplicar de forma intencionada para inducir las defensas de la planta contra diversas enfermedades fitosanitarias. La resistencia inducida comienza alrededor del lugar en donde se encuentra la lesión causada por el patógeno o el punto de aplicación del compuesto químico (Agrios, 2005), denominándose en este momento resistencia local. Posteriormente la resistencia inducida puede extenderse al resto de la planta, denominándose entonces resistencia sistémica.

La resistencia sistémica puede ser de dos tipos:

- Resistencia sistémica inducida (ISR)
- Resistencia sistémica adquirida (SAR)

La ISR se produce debido a la colonización de las plantas por ciertos tipos de organismos beneficiosos (como rizobacterias u hongos promotores del crecimiento, por ejemplo) mientras que la SAR se produce por la presencia de ciertos agentes externos, tanto biológicos (infecciosos o no), como químicos. Un ejemplo de éstos últimos son la laminarina o el acibenzolar-S-metil, o ASM (Walters *et al.*, 2013).

La activación de defensas de la planta es un proceso regulado por fitohormonas. El ácido jasmónico y el etileno son los principales reguladores de la ISR y la defensa contra herbívoros, que es efectiva también contra hongos necrotróficos. Por otro lado, el ácido salicílico regula la SAR, que es efectiva contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos, además de ser un centro regulador de inmunidad en general, interactuando con otras señales reguladoras con el fin de aumentar la eficiencia de la respuesta inmune y reducir el coste energético de esta. Otras hormonas implicadas son las auxinas y el ácido abscísico. Todas ellas interactúan entre sí para modular la resistencia (Denancé *et al.*, 2013).

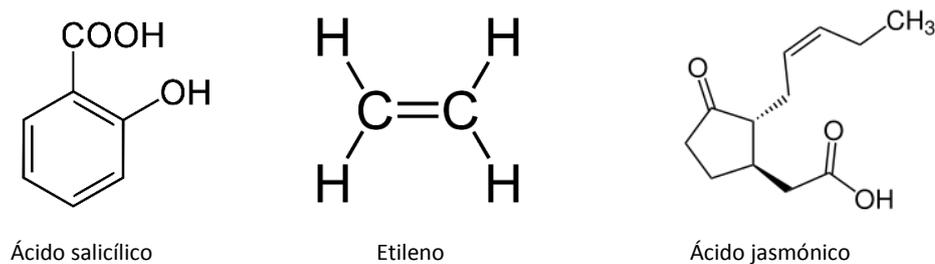


Figura 7. Hormonas implicadas en la resistencia inducida (Wikipedia, 2019)

Los mecanismos implicados en la defensa de la planta incluyen la expresión de genes defensivos, la síntesis de enzimas con actividad fungicida (inhibiendo, por ejemplo, el avance de alguna de las fases del ciclo vital del hongo), el engrosamiento de la pared o el aumento de la producción de los fenoles de los que se hablará a continuación ya que su cuantificación forma parte de los experimentos realizados en este TFG (Walters *et al.*, 2013).

Debe tenerse en cuenta que la resistencia inducida tiene ciertos inconvenientes y limitaciones. Es un método de control que generalmente no elimina completamente la infección de la planta. Además, la activación de la respuesta defensiva de la planta le supone un coste energético, lo que significa que invertirá parte de los recursos que tenga disponibles en producir defensas en vez de en otras funciones importantes para su desarrollo. Por el momento, la inducción de resistencia por sí sola no es suficiente en todas las situaciones, pero combinado con otros métodos de control puede incrementar la eficacia del tratamiento, reduciendo los costes tanto económicos como ambientales al disminuir la cantidad de pesticidas utilizados (Lamberth, 2012).

## 1.5. Papel de los polifenoles en la defensa de la planta

Los fenoles son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a una molécula de benceno u otro anillo aromático. Los polifenoles son aquellos que presentan más de un anillo aromático. Son un tipo de metabolitos secundarios relacionados, entre otras funciones, con la defensa contra patógenos (IUPAC, 1997).

El efecto que los compuestos fenólicos tienen en las defensas de la planta consiste tanto en inhibir directamente al patógeno como en reforzar las defensas estructurales de la planta para impedir o retrasar la penetración y el crecimiento del patógeno (El Modafar & El Boustani, 2001; Ma *et al.*, 2018).

Algunos derivados fenólicos inhiben enzimas fúngicas, restringiendo la virulencia del agente infeccioso, y se localizan en la pared vegetal como primera barrera defensiva. Los compuestos fenólicos varían entre especies, y los distintos compuestos fenólicos exhiben respuestas distintas a los distintos patógenos (Nagy *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2018). Un ejemplo que muestra las propiedades protectoras de los fenoles es el del ácido clorogénico, que tiene propiedades antioxidantes, inhibe la germinación de esporas y provoca la lisis de la membrana fúngica de *Botrytis cinerea* (Tamagnone *et al.*, 1998).

La síntesis de los compuestos fenólicos depende de la ruta del fenilpropanoide, en la que la fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la primera reacción. La cinamato 4-hidroxylasa (C4H) convierte el ácido cinámico en p-ácido coumárico, que sirve de sustrato para la 4-coumarato coA ligasa. Así mismo, la cinamil alcohol deshidrogenasa es una enzima clave para la síntesis de lignina, que es otro compuesto que protege a la planta estructuralmente de la infección del hongo al fortificar la pared celular de las células vegetales (Ma *et al.*, 2018).

## 2. OBJETIVOS

- 1- Estudiar la capacidad del pirimetanil como agente fitosanitario, evaluando experimentalmente su capacidad como fungicida y como inductor de resistencia (nivel local y sistémico) para proteger a la planta de la judía contra el hongo patógeno *Botrytis cinerea*.
- 2- Observar experimentalmente los efectos del pirimetanil sobre el contenido de fenoles en la planta de la judía.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Material vegetal

Se sembraron semillas comerciales de judía (*P. vulgaris*) en perlita, regadas con solución nutritiva de Hoagland y Arnon (1950). Se dejaron crecer 6 días bajo condiciones de 16 horas de luz a 25°C y 8 horas de oscuridad a 18°C en una cámara de cultivo. Tras este periodo se seleccionaron las 18 plántulas con el mejor aspecto, se trasladaron a macetas con una mezcla de tierra y perlita en una proporción de 3:1 y se llevaron de nuevo a la cámara de cultivo. Tras 4 días de crecimiento, se seleccionaron las 12 plantas que presentaron el aspecto más adecuado para realizar el experimento.

## **3.2. Material fúngico**

Se utilizó el aislado B0510 de *Botrytis cinerea* proporcionado por el Dr. J.A.L. van Kan (WUR, Países Bajos), el cual se mantuvo con repicados periódicos, utilizando placas con medio de agar de dextrosa de patata (PDA) en condiciones de oscuridad a 23 °C, hasta el momento de la inoculación.

## **3.3. Tratamiento con pirimetanil**

Se dividieron las 12 plantas seleccionadas en 2 grupos de 6 plantas cada uno. En uno de los grupos se pulverizó una hoja por planta (denominada local), dejando la otra sin tratar (denominada sistémica), con 10 ml de una solución de pirimetanil de concentración 0,2% p/v, rociando dorso y envés con 5 ml cada uno. El otro grupo de 6 plantas recibió un tratamiento similar con agua destilada para ser utilizado como control. Tras esto las plantas se llevaron de nuevo a la cámara de cultivo (16 h de luz a 25°C/8h de oscuridad a 18°C).

## **3.4. Inoculación y síntomas**

24 horas después del tratamiento con pirimetanil, las plantas fueron inoculadas con discos de micelio de un cultivo de *B. cinerea* con 4 días de crecimiento. Se colocó un disco de micelio a cada lado del nervio central en el haz de cada hoja (4 discos en total, 2 por hoja), de forma que el hongo quedara en contacto con la superficie de las hojas. A continuación, las plantas inoculadas se mantuvieron en la cámara de cultivo en condiciones de humedad elevada para optimizar el crecimiento del hongo. Para conseguir las condiciones de humedad los grupos de plantas se colocaron en cajas de plástico en cuyo fondo se introdujo previamente un papel de filtro humedecido con agua.

A las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación, se realizó la medida de los diámetros mayor y menor de las lesiones provocadas por el hongo, y se calculó el área de estas a partir de las medidas obtenidas.

El experimento indicado en los pasos anteriores se realizó un total de dos veces.

## **3.5. Determinación del contenido de fenoles solubles totales**

### **3.5.1. Obtención de las muestras vegetales**

Las plantas de judía fueron obtenidas por el procedimiento descrito anteriormente. Se escogieron 6 plantas y se dejaron creciendo en la cámara de cultivo durante 4 días.

Las 6 plantas se dividieron en 2 grupos de 3. Las 3 plantas de un grupo fueron tratadas con una solución de pirimetanil similar a la utilizada anteriormente a nivel local, y 3 las plantas del otro grupo fueron rociadas con agua para utilizarlas como control. Después de 24 horas tras el tratamiento, las hojas se almacenaron a -80 °C para el posterior análisis de fenoles, en grupos de 3 hojas pertenecientes a las 3 plantas de cada uno de los 2 grupos,.

El proceso de preparación y obtención de muestras se realizó por triplicado

### **3.5.2. Extracción de fenoles.**

Las muestras se homogenizaron en un mortero con 10 ml de metanol al 80%. Se recogió el homogenizado y se incubó a 70°C durante 15 minutos. Una vez frío, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante. Se resuspendió de nuevo el precipitado en 5 ml de metanol al 80%, y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se le añadió el sobrenadante anterior, enrasándolo a 16 ml con metanol 80%. Esta fue la muestra en la que se cuantificó el contenido en compuestos fenólicos.

### **3.5.3. Medida de los fenoles. (Singleton *et al.*, 1965)**

El contenido de fenoles se determinó por cuadruplicado en cada muestra. Para cada reacción se utilizaron 50 µl de la muestra, posteriormente se añadieron 750 µl de agua y 50 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se preparó un control para ser utilizado como blanco sustituyendo los 50 µl de muestra por metanol al 80%. Se agitaron los tubos y se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 150 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%, se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Por último se midió la absorbancia del contenido de los tubos a 760 nm.

Se preparó también una recta patrón con ácido gálico para calcular la cantidad de fenoles presentes en las muestras. La recta se realizó con tres soluciones de ácido gálico en metanol al 80%, de concentraciones 0,01mg/ml, 0,02 mg/ml y 0,1 mg/ml. Se utilizó el mismo procedimiento que para las muestras, con la diferencia de que los 50 µl de muestra se sustituyeron por 50 µl de las diferentes soluciones de ácido gálico.

Los resultados obtenidos se expresaron en mg/ g de peso fresco.

## **3.6. Estadística**

En los ensayos de severidad se ha evaluado la existencia de diferencias significativas entre el control y el tratamiento mediante la prueba de Mann-Whitney, y para los datos de fenoles se ha utilizado una t de Student. En ambos casos se consideraron diferencias significativas con un p-valor <0.05.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Ensayos de severidad**

Las hojas de judía han sido inoculadas con *Botrytis cinerea* 24h después de recibir el tratamiento con pirimetanil o agua (control), y se han medido los síntomas 48 y 72 horas después de la inoculación. A nivel local (hojas rociadas con agua destilada o pirimetanil), ha habido una reducción significativa del área con síntomas por hoja tanto a las 48 como a las 72 horas tras la inoculación en las plantas tratadas con pirimetanil respecto a las plantas control (Figura 8). A nivel sistémico (hojas no rociadas) también se ha observado una reducción del área con

síntomas en las plantas tratadas con pirimetanil, pero dicha reducción sólo ha resultado significativa a las 72 horas (Figura 9).

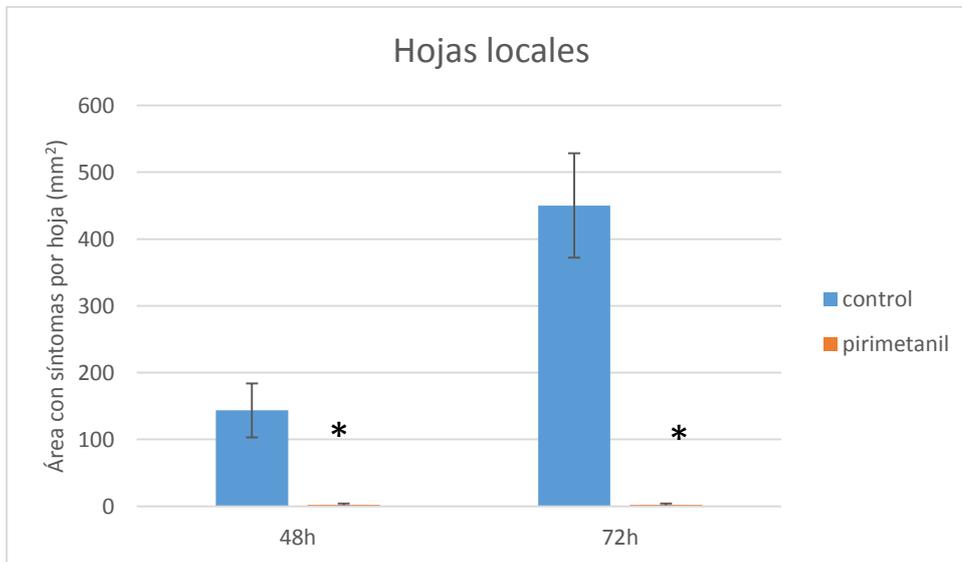


Figura 8. Severidad de las lesiones provocadas por *Botrytis cinerea* sobre las hojas locales de las plantas de la judía 48 y 72 horas después de la inoculación, expresado en forma del área de crecimiento de la infección por hoja en mm<sup>2</sup>. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el área de expansión por hoja entre las plantas control y las tratadas.

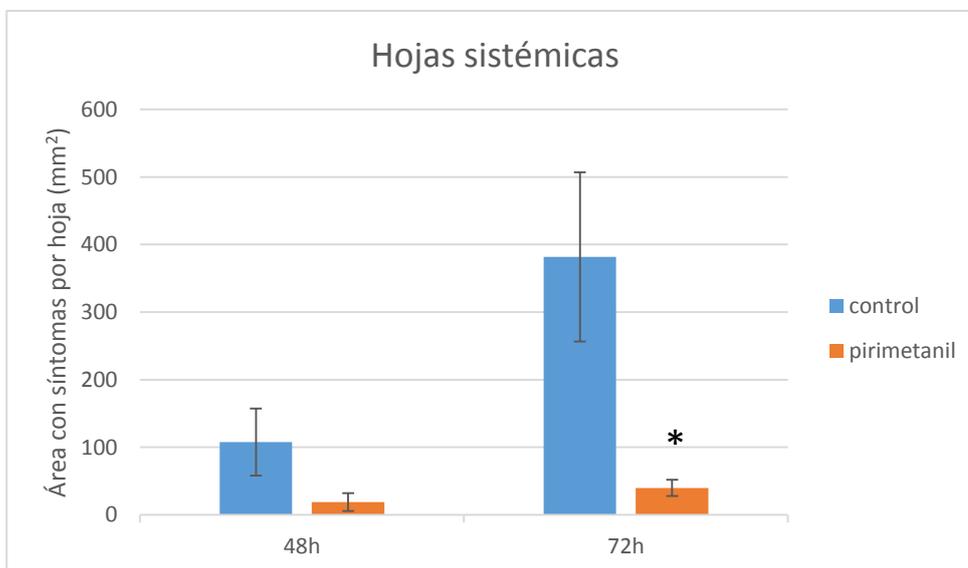


Figura 9. Severidad de las lesiones provocadas por *Botrytis cinerea* sobre las hojas sistémicas de las plantas de la judía 48 y 72 horas después de la inoculación, expresado en forma del área de crecimiento de la infección por hoja en milímetros cuadrados. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el área de expansión por hoja entre las plantas control y las tratadas.

## 4.2. Medida de fenoles totales

Se ha medido el contenido de fenoles en hojas de plantas de judía tratadas con pirimetanil o agua destilada (control). El tratamiento con pirimetanil no provocó cambios significativos en el contenido fenólico de las hojas respecto al control (Figura 10).

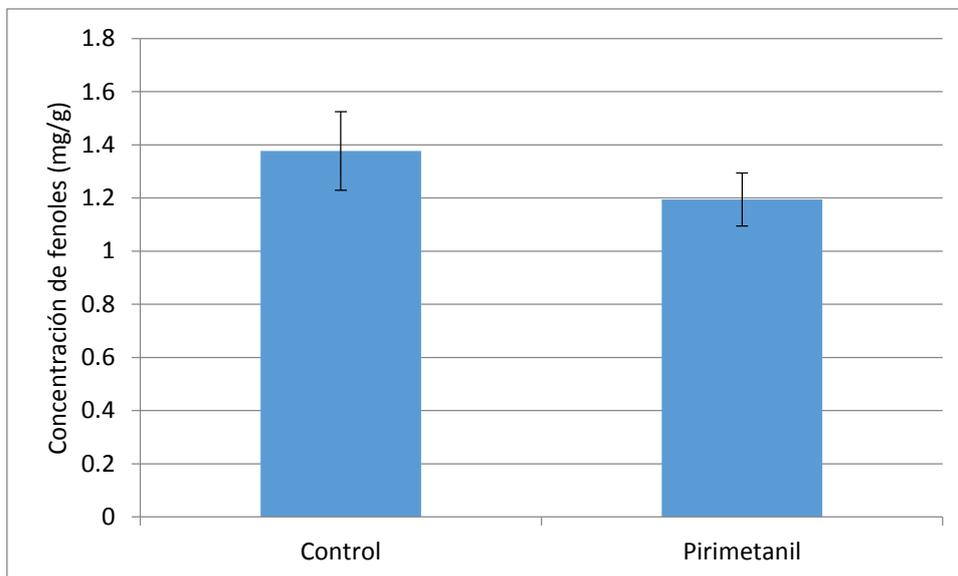


Figura 10. Contenido de fenoles solubles en hojas de plantas de judía tratadas con agua destilada (control) y pirimetanil, expresado en miligramos por gramo de peso fresco. No se han observado diferencias significativas entre los dos tratamientos.

## 5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han estudiado los efectos del pirimetanil a nivel local y sistémico en plantas tratadas con este compuesto. Se ha observado una reducción significativa de la infección a nivel local 48 horas después de haber inoculado a la planta con *Botrytis cinerea*, y a nivel local y sistémico tras 72 horas desde la inoculación.

Existen muchos trabajos en los que se evidencia la efectividad del pirimetanil como fungicida, y se observa que su modo de acción se debe, en parte, a una inhibición de la síntesis de metionina. Por ejemplo, en el trabajo de Masner (1994) se observó que el pirimetanil tenía un efecto inhibitor del crecimiento de *Botrytis cinerea*, efecto que fue revertido al aplicar soluciones de distintos aminoácidos, entre los que destacó la metionina. El trabajo de Leroux *et al.* (1995) apoya estos resultados al incorporar sulfuro marcado radiactivamente, revelando efectivamente a la ruta de síntesis de la metionina como principal diana del fungicida. Los efectos que esto supone para el hongo suelen traducirse en la inhibición del crecimiento del tubo germinativo y del crecimiento micelial inicial, lo que controla de forma bastante eficiente a la enfermedad. En el experimento de Belle *et al.* (2018) utilizando *Vitis vinífera* como planta modelo, el crecimiento del hongo era severa o completamente inhibido a medida que aumentaba la concentración de la solución de pirimetanil empleada. En el trabajo de Kim *et al.* (2016) sobre la fresa, el tratamiento con pirimetanil también produjo efectos inhibitorios muy altos. En el mismo trabajo se demostró que este compuesto tiene un alto efecto inhibitorio sobre la germinación de conidios de *Botrytis*.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, y teniendo en cuenta que en el presente trabajo se ha trabajado con el micelio del hongo, la reducción de las lesiones observadas en las hojas locales (que han recibido el tratamiento directamente) de las plantas tratadas con pirimetanil probablemente se deba a que el crecimiento del micelio se ha visto severamente afectado. El efecto sobre el crecimiento podría estar mediado por la inhibición de la síntesis de metionina, tal y como se ha sugerido en otros trabajos. Los datos obtenidos corroboran que, como se ha mencionado anteriormente (Lamberth, 2012), el pirimetanil destaca como fungicida preventivo, ya que muestra una gran efectividad en las hojas tratadas al ser aplicado antes de la inoculación.

No obstante, en el presente trabajo, además de su efecto a nivel local se ha observado que el pirimetanil tiene efectos significativos a nivel sistémico. En las hojas sistémicas, 72 horas después de la inoculación, se han observado diferencias significativas en la expansión del área lesionada en las plantas tratadas con respecto a las plantas control. A las 48 horas no se observaron diferencias significativas, pero sí parece observarse una tendencia a una menor incidencia de la enfermedad en las plantas tratadas. La ausencia de significación estadística podría deberse a la alta variabilidad biológica observada en los experimentos.

El hecho de que en las hojas sistémicas haya habido una reducción significativa de la incidencia de la enfermedad sugiere que el pirimetanil podría haber provocado un incremento de las defensas en la planta. En el presente trabajo, el pirimetanil ha reducido en un 89% la incidencia de la enfermedad en comparación con el control a las 72 horas en las hojas sistémicas *in vivo* bajo condiciones controladas. Si se comparan estos resultados con los obtenidos en otros trabajos con elicitors conocidos se puede observar que la capacidad de este compuesto como elicitor es notable. Por ejemplo, VNT (vanillil nonanoato) provocó una reducción de aproximadamente el 50% de la expansión de la enfermedad de *Botrytis cinerea* 72 horas después de haber sido inoculado con conidios del hongo en las hojas del pimiento a nivel sistémico (García *et al.*, 2018). Otro ejemplo es el ácido  $\beta$  aminobutírico, o BABA, que provocó una reducción del 70% de la infección de *Botrytis cinerea* 3 días después de la inoculación a nivel sistémico en experimentos de campo (Wilkinson *et al.*, 2018) En el trabajo de Aziz *et al.* (2003), la laminarina provocó *in vitro* una reducción de la expansión de las lesiones del 55% después de que transcurrieran 4 días tras la inoculación. El ácido hexanoico bajo condiciones hidropónicas, provocó una reducción de la expansión de la enfermedad de *Botrytis cinerea* del 48% en las hojas del tomate 72h después de la inoculación a nivel local (Vicedo *et al.*, 2009).

Ya que el pirimetanil parece inducir las defensas de la planta, se ha realizado una cuantificación de fenoles, ya que existen numerosos trabajos que demuestran la implicación de los estos compuestos en el proceso. Por ejemplo, en un estudio con plantas de tabaco (Tamagnone *et al.*, 1998), se observó que el ácido clorogénico inhibía por completo la germinación de las esporas de *Botrytis cinerea*, además de provocar la lisis de la membrana fúngica. Otro estudio reveló que el ácido ferúlico es otro fenol que se acumula en la pared celular cuando se induce resistencia para inhibir el crecimiento miceliar (El Modafar & El Boustani, 2001). En un experimento hecho con 2 variedades de manzano, se observó que había 4 enzimas implicadas en la respuesta a *Botrytis cinerea*. Tres de ellas catalizaban reacciones en la ruta del fenilpropanoide (como se mencionaba anteriormente, es la ruta de la que depende la biosíntesis de fenoles), y la 4ª participaba en la síntesis del precursor de la lignina. Al incrementarse la actividad de estas enzimas aumentan en consecuencia las concentraciones de ácido fenólico, flavonoides, y lignina (MA *et al.*, 2018). No obstante, en el

presente trabajo no se han observado diferencias significativas entre las hojas control y tratadas con pirimetanil.

Tal y como se ha mencionado, los fenoles son metabolitos secundarios de gran importancia para la defensa de las plantas contra elementos patógenos, por lo que la ausencia de incremento de su concentración en el presente trabajo resulta llamativa. La ausencia de diferencias significativas podría ser debida a que los fenoles estén siendo consumidos en otras rutas de la planta, como por ejemplo en la formación de ligninas. Así mismo, es posible que la resistencia observada en las hojas sistémicas de los ensayos de severidad haya sido provocada por otros mecanismos. En el trabajo de Bellée *et al.* (2018) realizado en *Vitis vinifera*, el tratamiento con pirimetanil, además de producir un incremento significativo en la cantidad de polifenoles, también produjo un incremento la expresión de varios genes defensivos de la planta tratada. Entre ellos destaca el VvPR3, relacionado con la síntesis de una quitinasa que actúa inhibiendo el crecimiento del hongo, y varios genes relacionados con la regulación de las rutas de ciertas fitohormonas como el ácido salicílico, el etileno y el ácido jasmónico (Mohammed *et al.*, 2007). Estas observaciones sugieren que en el presente trabajo el mecanismo implicado en la inducción de resistencia en las plantas podría ser independiente de la producción de fenoles. Un análisis de la expresión de los genes relacionados con las defensas de la planta podría ayudar a clarificar los mecanismos de la resistencia inducida por pirimetanil en el presente trabajo.

Además, debe tenerse en cuenta que en el trabajo de Bellée *et al.* (2018) se sugirió la posibilidad de que la inducción de las defensas causada por el pirimetanil podría ser en realidad una “PAMP Triggered Immunity” (PTI), consistente en una respuesta defensiva provocada por la detección de las PAMP, que se liberan como consecuencia del efecto fungicida del pirimetanil sobre el hongo. De ser esto así la respuesta defensiva sólo se produciría tras la inoculación del hongo. Esto podría explicar la ausencia de variaciones significativas en la medición de fenoles ya que en el análisis de estos no se ha inoculado a las plantas tratadas. Sería necesario realizar un análisis de fenoles en hojas inoculadas para clarificar el papel de las PAMP en la inducción de las defensas de la judía.

## 6. CONCLUSIONES

### 6.1. Castellano

1- La aplicación exógena de pirimetanil en hojas de *Phaseolus vulgaris* ha provocado una reducción significativa de la expansión de las lesiones causadas por *Botrytis cinerea* a nivel local tanto 48 como 72 horas después de la inoculación, verificando la capacidad de este agente fitosanitario como fungicida. A nivel sistémico se ha observado una reducción significativa de la expansión de las lesiones 72 horas después de la inoculación, lo que sugiere que el pirimetanil podría actuar también como inductor de las defensas de la planta contra el hongo.

2- El pirimetanil no ha producido una variación significativa en el contenido de fenoles de las hojas en las que fue aplicado.

## 6.2. Galego

1- A aplicación exóxena do pirimetanil en follas de *Phaseolus vulgaris* provocou unha redución significativa da expansión das lesións causadas por *Botrytis cinerea* a nivel local tanto 48 como 72 horas despois da inoculación, verificando a capacidade deste axente fitosanitario como funguicida. A nivel sistémico observouse unha redución significativa da expansión das lesións 72 horas despois da inoculación, o que suxire que o pirimetanil podería actuar tamén como inductor das defensas da planta contra o fungo.

2- O pirimetanil non produciu unha variación significativa no contido de fenoles das follas nas que foi aplicado.

## 6.3. English

1- External application of pyrimethanil in *Phaseolus vulgaris* leaves has caused a significant reduction in the expansion of the lesions caused by *Botrytis cinerea* locally both 48 and 72 hours after the inoculation, verifying the capacity of this phytosanitary agent as a fungicide. At the systemic level, a significant reduction in the expansion of the lesions was observed 72 hours after the inoculation, which suggests that pyrimethanil could be also acting as an inductor of the plant defenses against the fungus.

2- Pyrimethanil has not produced a significant variation in the content of phenols of the leaves in which it was applied.

## 7. BIBLIOGRAFÍA:

- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology (5ª edición). California, Estados Unidos de América. Elsevier Academic Press.
- Amselem, J., Cuomo, C. A., Van Kan, J. A., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., ... & Fournier, E. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS genetics*, 7(8), e1002230.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., ... & Pugin, A. (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(12), 1118-1128.
- Bellée, A., Cluzet, S., Dufour, M. C., Méillon, J. M., & Corio-Costet, M. F. (2018). Comparison of the impact of two molecules on plant defense and on efficacy against *Botrytis cinerea* in the vineyard: A plant defense inducer (Benzothiadiazole) and a Fungicide (Pyrimethanil). *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(13), 3338-3350.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A., & Viaud, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS microbiology letters*, 277(1), 1-10.
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D., & Molina, A. (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in plant science*, 4, 155.
- El Modafar, C., & El Boustani, E. (2001). Cell wall-bound phenolic acid and lignin contents in date palm as related to its resistance to *Fusarium oxysporum*. *Biologia plantarum*, 44(1), 125-130.
- FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/> [19-06-2019]
- FIRA. (2016). Panorama Agroalimentario | Frijol 2016. *Panorama Agroalimentario*, 36. Retrieved from [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200638/Panorama\\_Agroalimentario\\_Frijol\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200638/Panorama_Agroalimentario_Frijol_2016.pdf)
- García, T., Veloso, J., & Díaz, J. (2018). Vanillyl nonanoate induces systemic resistance and lignification in pepper plants. *Journal of Plant Physiology*, 231(August), 251–260.
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology*, 10(13), 751-757.
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of chemical biology*, 7(4), 133-141.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil (2ª edición). *Circular. California agricultural experiment station*, 347.

- Kim, J. O., Shin, J. H., Gumilang, A., Chung, K., Choi, K. Y., & Kim, K. S. (2016). Effectiveness of different classes of fungicides on *Botrytis cinerea* causing gray mold on fruit and vegetables. *The plant pathology journal*, 32(6), 570.
- McNaught, A. D., & McNaught, A. D. (1997). IUPAC. Compendium of chemical terminology (Vol. 1669). Oxford: Blackwell Science.
- Lamberth, C. (2012). Methionine biosynthesis-inhibiting anilinopyrimidine fungicides. *Bioactive Heterocyclic Compound Classes*, 147-154.
- Leroux, P. (2007). Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. In *Botrytis: Biology, pathology and control*(pp. 195-222). Springer, Dordrecht.
- Ma, L., He, J., Liu, H., & Zhou, H. (2018). The phenylpropanoid pathway affects apple fruit resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 166(3), 206-215.
- Mohamed, N., Lherminier, J., Farmer, M. J., Fromentin, J., Béno, N., Houot, V., ... & Blein, J. P. (2007). Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitor, oligandrin, to roots. *Phytopathology*, 97(5), 611-620.
- Nagy, N. E., Fossdal, C. G., Krokene, P., Krekling, T., Lönneborg, A., & Solheim, H. (2004). Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiology*, 24(5), 505-515.
- Rosslénbroich, H. J., & Stuebler, D. (2000). *Botrytis cinerea*—history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19(8-10), 557-561.
- Sillero, J. C., Rojas-Molina, M. M., Ávila, C. M., & Rubiales, D. (2012). Induction of systemic acquired resistance against rust, ascochyta blight and broomrape in faba bean by exogenous application of salicylic acid and benzothiadiazole. *Crop Protection*, 34, 65-69.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Tamagnone, L., Merida, A., Stacey, N., Plaskitt, K., Parr, A., Chang, C. F., ... & Martin, C. (1998). Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *The Plant Cell*, 10(11), 1801-1816.
- Tamm, L., Thürig, B., Fliessbach, A., Goltlieb, A. E., Karavani, S., & Cohen, Y. (2011). Elicitors and soil management to induce resistance against fungal plant diseases. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 58(3-4), 131-137.
- Van Kan, J. A., Shaw, M. W., & Grant-Downton, R. T. (2014). Botrytis species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue?. *Molecular plant pathology*, 15(9), 957-961.
- Veloso, J., & van Kan, J. A. (2018). Many shades of grey in Botrytis–host plant interactions. *Trends in plant science*, 23(7), 613-622.

Vicedo, B., Flors, V., de la O Leyva, M., Finiti, I., Kravchuk, Z., Real, M. D., ... & González-Bosch, C. (2009). Hexanoic acid-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(11), 1455-1465.

Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of experimental botany*, 64(5), 1263-1280.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5), 561-580.

Wilkinson, S. W., Pastor, V., Paplauskas, S., Pétriacq, P., & Luna, E. (2018). Long-lasting  $\beta$ -aminobutyric acid-induced resistance protects tomato fruit against *Botrytis cinerea*. *Plant pathology*, 67(1), 30-41.

Wikipedia. <https://it.wikipedia.org/> [19-06-2019]