

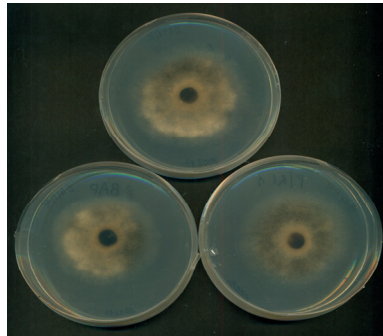
Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Propiedades inhibitorias de la bencilaminopurina en aislados de *Botrytis cinerea* con distinta sensibilidad a ciprodinil

Propiedades inhibitorias da bencilaminopurina en aillados de *Botrytis cinerea* con distinta sensibilidade a ciprodinil

Inhibitory properties of benzylaminopurine in *Botrytis cinerea* isolates with different sensitivity to cyprodinil



Iris Debasa López

Septiembre, 2020

*Director 1: José Díaz Varela
Director 2: Javier Veloso Freire*



D. JOSÉ DÍAZ VARELA, CATEDRÁTICO DE FISIOLOXÍA VEXETAL E D. JAVIER VELOSO FREIRE, CONTRATADO POSDOUTORAL XUNTA, DO DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA DA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que o presente Traballo de Fin de Grado presentado pola alumna IRIS DEBASA LÓPEZ e titulado

“Propiedades inhibitorias de la bencilaminopurina en aislados de *Botrytis cinerea* con distinta sensibilidad a ciprodinil”

“Propiedades inhibitorias da bencilaminopurina en aillados de *Botrytis cinerea* con distinta sensibilidade a ciprodinil”

“Inhibitory properties of benzylaminopurine in *Botrytis cinerea* isolates with different sensitivity to cyprodinil”

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 14 de Setembro de 2020.

Asdo. José Díaz Varela

Asdo. Javier Veloso Freire

ÍNDICE

RESUMEN:	2
RESUMO:	2
ABSTRACT:	2
Palabras clave:	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 <i>Botrytis cinerea</i>	4
1.2 Anilinopirimidinas: Pirimetanil	8
1.2. 1 Resistencia a anilinopirimidinas	9
1.3 Citoquininas: 6-Bencilaminopurina (BAP).....	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1 Material fúngico.....	12
3.2 Estudio del efecto fungicida en el micelio de <i>Botrytis cinerea</i>	12
3.3 Estudio del efecto fungicida en la germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i> .	13
3.3 Análisis estadístico.....	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Estudio de la inhibición del crecimiento del micelio del hongo.....	15
4.2. Estudio de germinación de los conidios	16
5. DISCUSIÓN	18
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	19
7. BIBLIOGRAFÍA	20

RESUMEN:

Botrytis cinerea Pers.:Fr. es un hongo patógeno de plantas, tiene forma de vida necrotrófica y es el agente causal de la podredumbre gris. Su forma sexual es el teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* Whetzel, que raras veces se observa. El anamorfo *Botrytis cinerea* se reproduce asexualmente y forma conidios que provocan la infección primaria en plantas. En este trabajo se ha comparado el efecto fungicida de la bencilaminopurina (BAP) y del pirimetanil (PIRI) en dos aislados con distinta sensibilidad a ciprodinil, un fungicida análogo al pirimetanil. Se realizaron ensayos para estudiar la inhibición del crecimiento del micelio, de la germinación de conidios y del crecimiento del tubo germinativo. Mientras que el pirimetanil inhibió significativamente a *Botrytis cinerea* en todos los ensayos, la bencilaminopurina solamente lo hizo en algunos casos.

RESUMO:

Botrytis cinerea Pers.:Fr. é un fungo patóxeno de plantas, ten forma de vida necrotrófica e é o axente causal da podremia gris. A súa forma sexual é o teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* Whetzel que raras veces se observa. O anamorfo *Botrytis cinerea* reproducécese asexualmente e forma conidios que provocan a infección primaria en plantas. Neste traballo comparouse o efecto funxicida da bencilaminopurina (BAP) e do pirimetanil (PIRI) en dous illados con distinta sensibilidade a ciprodinil, un funxicida análogo ao pirimetanil. Realizáronse ensaios para estudar a inhibición do crecemento do micelio, da xerminación de conidios e do crecemento do tubo xerminativo. Mentres que o pirimetanil inhibiu significativamente a *Botrytis cinerea* en todos os ensaios, a bencilaminopurina soamente o fixo nalgúns casos.

ABSTRACT:

Botrytis cinerea Pers.:Fr. is a plant pathogenic fungus with a necrotroph lifestyle and is the causal agent of grey mould. Its sexual form is the teleomorph *Botryotinia fuckeliana* Whetzel, which is rarely observed. The reproduction of anamorphic *Botrytis*

cinerea is asexual, forming conidia that cause the primary infection in plants. In this study we compared the fungicide effect of benzylaminopurine (BAP) and pyrimethanil (PIRI) in two isolates with different sensitivity to cyprodinil, a fungicide analogue of pyrimethanil. Assays were carried out to study the inhibition of mycelial growth, conidia germination, and germ tube growth. While pyrimethanil significantly inhibited *Botrytis cinerea* in all assays, benzylaminopurine only did it in some cases.

Palabras clave: bencilaminopurina, *Botrytis cinerea*, fungicida, pirimetanil, resistencia.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers.:Fr. es un hongo fitopatógeno que posee una estructura filamentosa. Su parte vegetativa es el micelio que está constituido por hifas, a partir de las cuáles se originan los conidióforos, que producen conidios por reproducción asexual (Fig.1) (Latorre *et al.*, 2015). Es el anamorfo de *Botryotinia fuckeliana* Whetzel (Eladet *et al.*, 2007), un ascomiceto teleomorfo con una reproducción sexual poco habitual mediante cuerpos de fructificación.

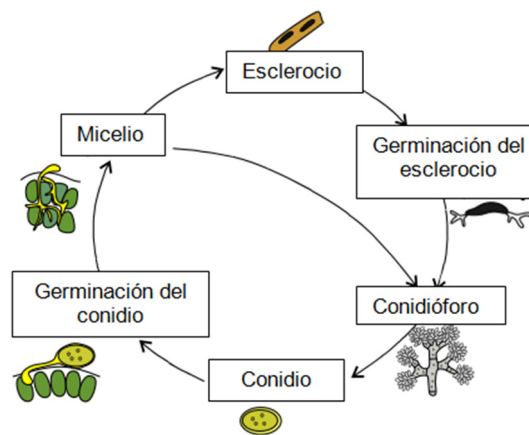


Fig.1: Ciclo asexual de infección de *Botrytis cinerea*

(Fuente: Wikimedia commons, 2020.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0a/Cycle_asexu%C3%A9_Botrytis_cinerea.svg)

Clasificación taxonómica:

Reino: Fungi; Phylum: Ascomycota; Subphylum: Pezizomycotina; Clase: Leotiomycetes; Orden: Helotiales; Familia: Sclerotiniaceae; Género: *Botrytis*; Especie: *Botrytis cinerea* (forma asexual).

(Fuente: Wikipedia, 2020)

Causa la podredumbre gris en una gran cantidad de cultivos (Fournier *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2018) incluyendo ornamentales (Fig.2), bulbos, hortalizas y frutas (Elad *et al.*,

2007; Juricket *et al.*, 2017; Latorre *et al.*, 2015). Puede atacar las hojas, tallos y frutos de forma necrotrófica y también de forma saprófita en material muerto y senescente de la planta (Leroux, 2007; Latorre *et al.*, 2015). Ocasiona importantes pérdidas económicas antes y después de la cosecha tanto en calidad como en cantidad, gastos en medidas fitosanitarias, costes a minoristas y consumidores por las instalaciones de refrigeración y daños ocasionados por la pudrición de las plantas (Hahn, 2014).



Fig.2: Síntomas de la infección por podredumbre gris en una rosa

(Fuente: Wikipedia, 2020)

Botrytis cinerea influye en el equilibrio entre los distintos tipos de muerte celular programada (autofagia y apoptosis) desencadenando distintas respuestas al interaccionar con el huésped. Por un lado, se puede desarrollar autofagia, lo que genera resistencia a la infección. Por otro lado, el huésped puede ser colonizado sin perturbarse el equilibrio, siendo este tipo de colonización asintomática. Por último, puede suprimirse la autofagia en las primeras etapas (infección biotrófica) desencadenando luego la apoptosis (infección necrotrófica) que genera susceptibilidad y provoca síntomas de la enfermedad en la planta (Veloso y van Kan, 2018).

Botrytis utiliza distintos mecanismos para atacar las células de los tejidos vegetales que infecta: producción de un estallido oxidativo, secreción de enzimas degradativas de la pared celular y producción de metabolitos fitotóxicos no específicos, por ejemplo, botridial (Wang *et al.*, 2018), que al acumularse en el tejido infectado provoca un aumento de la toxicidad. Las toxinas que genera el hongo son las encargadas de la muerte de las células vegetales (Wang *et al.*, 2018; Petrasch *et al.*, 2019). La producción

de ácido oxálico durante la infección por *Botrytis* puede actuar como un cofactor en la patogénesis aunque este ácido es más importante en otros necrotrofos, como por ejemplo *Sclerotinia* (van Kan, 2006). Recientemente, se ha observado que los sRNA también juegan un papel importante para la virulencia de *Botrytis* ya que durante las primeras etapas de infección se produce un bloqueo de la respuesta inmunitaria del huésped debido a la producción de sRNA (Veloso y van Kan, 2018).

A partir de una hifa del micelio del hongo se forman unos órganos de penetración llamados apresorios. El ciclo de infección comienza cuando la clavija de penetración formado en el apresorio rompe la cutícula de la célula huésped (Latorre *et al.*, 2015), permitiendo que atraviese la pared y llegue a la membrana celular vegetal (Fig.3). La infección está favorecida por largos períodos de alta humedad, temperaturas de alrededor a 15-22°C y un pH ambiental bajo que produce la secreción de varias enzimas que estimulan la secreción de oxalato (Elad *et al.*, 2007).

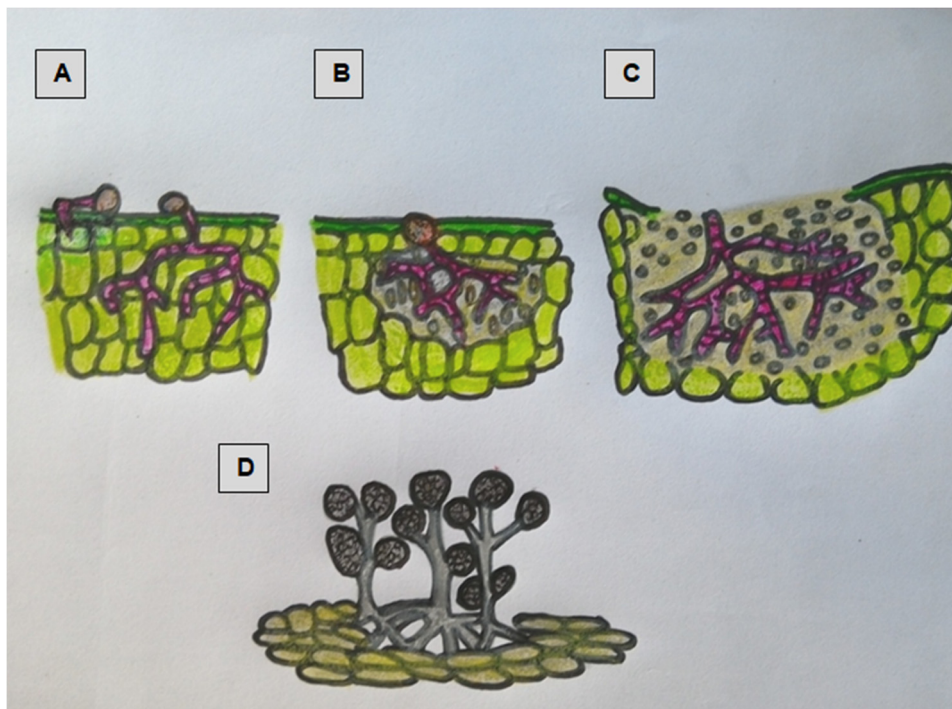


Fig.3: Germinación de conidios, formación de apresorios y colonización de los tejidos (A). Colapso y desintegración de las células (B). Pudrición de tejidos (C). Moho gris sobre tejido infectado (D). Dibujo de realización propia, 2020.

Este patógeno presenta diferentes enzimas que actúan secuencialmente según las distintas fases en el proceso de patogénesis. La cutinasa es una enzima hidrolítica que cataliza la degradación de cutina e interviene en la fase de penetración en la cutícula. En esta fase de penetración ocurre el estallido oxidativo al cual contribuye la superóxido dismutasa (BcSOD1) y también las NADPH oxidasas (Williamson *et al.*, 2007; Elad *et al.*, 2007). Las enzimas hidrolíticas extracelulares (entre las que destacan, endo- y exo-poligalacturonasas, pectin metilesterasas, pectin liasas y enzimas celulolíticas) degradan la pared celular vegetal. La acción de las endopoligalacturonasas es facilitada por las metilesterasas de pectina (van Kan, 2006). También se producen proteasas que digieren la pared celular al romper los enlaces peptídicos (Benito E. *et al.*, 2000). Además, *Botrytis* tiene el potencial de liberar altos niveles de calcio unidos a sustancias pécticas en la pared celular (Elad *et al.*, 2007) y su genoma contiene varias lipasas que tienen un papel muy relevante en su patogenicidad (van Kan, 2006).

Para combatir la podredumbre gris se puede emplear el control biológico o el control químico. El control biológico consiste en introducir agentes de biocontrol (BCAs), que pueden ser hongos, bacterias, levaduras o virus, que reducen la progresión o incidencia de la enfermedad. Los BCAs eliminan los patógenos de las plantas mediante competencia por nutrientes o espacio, antibiosis, parasitismo y/o resistencia inducida en la planta huésped (Fedele *et al.*, 2020; Rios Velasco *et al.*, 2016; South *et al.*, 2020; Veloso *et al.*, 2016). El control químico consiste en aplicar fungicidas químicos tales como bencimidazoles, anilino pirimidinas, dicarboximidias, N-fenilcarbamatos, inhibidores externos de quinona, inhibidores de succinato deshidrogenasa o fenilpirroles (fluodioxonil). Un fungicida muy usado desde 2008 contra *Botrytis* es el boscalid (Fan *et al.*, 2017, Kim *et al.*, 2016). Sin embargo, el fluodioxonil es el fungicida más efectivo contra *Botrytis* ya que produce una inhibición de la germinación del 91% (Kim *et al.*, 2016). El compuesto 3-fenil-1-propanol también es muy agresivo y logra detener la germinación, el desarrollo del tubo germinativo y la esporulación (Rosero-Hernández *et al.*, 2019).

La sucesiva aplicación de fungicidas con modos de acción específicos puede seleccionar

cepas de *Botrytis* resistentes lo que provoca una disminución de la eficacia del compuesto químico a largo plazo. Además, el uso abusivo de los fungicidas puede causar efectos nocivos para los seres humanos y el medio ambiente (Rosero-Hernández *et al.*, 2019).

La capacidad de *Botrytis cinerea* para desarrollar resistencia a fungicidas químicos es resultado de su alta diversidad genética, ciclo de vida corto y su enorme capacidad para reproducirse asexualmente por conidios (Fernández-Ortuño *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2017).

1.2 Anilino pirimidinas: Pirimetanil

Las anilino pirimidinas (APs) como ciprodinil, pirimetanil y mepanipirima (Fig.4) representan una de las cuatro clases de fungicidas más usados contra *Botrytis* introducidos en la década de los 90. Son altamente activas contra el hongo ya que interfieren en la síntesis de aminoácidos y la secreción de proteínas (Hahn, 2014). Además, evitan la secreción de enzimas hidrolíticas fúngicas, por ejemplo, las lacasas, las proteasas, las lipasas e invertasas, y las enzimas degradativas de la pared celular (Mosbach *et al.*, 2017).

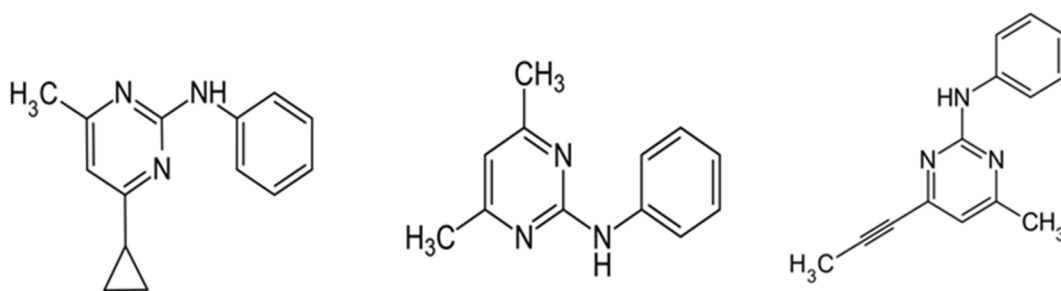


Fig.4: Estructura química de ciprodinil, pirimetanil y mepanipirima (izq. a der.)

(Fuente: Wikidata, 2020. <https://www.wikidata.org/wiki/Q3008902>;

<https://www.wikidata.org/wiki/Q7263600>; <https://www.wikidata.org/wiki/Q15632906>)

El pirimetanil inhibe la síntesis de metionina, entre otros aminoácidos, lo que interfiere en la formación de las proteínas y la división celular (Fan *et al.*, 2017; Fernández-Ortuño *et al.*, 2013).

1.2. 1 Resistencia a anilopirimidinas (APs)

En los 90, la efectividad de fungicidas usados contra *Botrytis* se debió en mayor parte a la introducción de APs, fludioxinil y en último lugar, fenhexamida (Faretra y Pollastro, 1991). La aplicación de APs con otros fungicidas permite combinar diferentes modos de acción, lo que hace más difícil el desarrollo de resistencias por parte del hongo.

Las cepas o aislados de *Botrytis* resistentes a APs muestran tres fenotipos diferentes de resistencia: Ani^{R1}, Ani^{R2} y Ani^{R3} (Mosbach *et al.*, 2017). Ani^{R1} muestra una resistencia elevada a APs, mientras que Ani^{R2} y Ani^{R3} muestran una resistencia parcial a APs. Ani^{R2} y Ani^{R3} deben su resistencia a bombas de secreción que reducen la concentración intracelular de APs, mientras que en el caso de Ani^{R1} se desconoce la causa de su resistencia, aunque se han investigado nueve proteínas mitocondriales que otorgan resistencia a las APs en *Botrytis cinerea* (Mosbach *et al.*, 2017).

1.3 Citoquininas: 6-Bencilaminopurina (BAP)

Las citoquininas son un grupo de hormonas vegetales (fitohormonas) derivadas de la adenina y están implicadas en diversos mecanismos de regulación de muchos procesos fisiológicos y de desarrollo de la planta, tales como la regulación del crecimiento, la senescencia foliar, la apoptosis vegetal, la nodulación, la movilización de los nutrientes, las respuestas a la luz, la dominancia apical o la germinación de las semillas (Espinosa de los Monteros, 2006). Altas concentraciones de estas fitohormonas como la 6-bencilaminopurina reducen de manera significativa el diámetro de la colonia de distintos hongos fitopatógenos (Sharma *et al.*, 2010).

Estas fitohormonas pueden ser tanto naturales (derivadas de las plantas) como sintéticas. Las naturales se pueden clasificar a su vez según la estructura de su cadena

lateral que va unida a carbono 6 de la purina en citoquininas aromáticas e isoprenoides (Espinosa de los Monteros, 2006). Dentro de las citoquininas isoprenoides destacan la zeatina (Fig.5), la isopenteniladenina y a dihidrozeatina, y entre las aromáticas se encuentran la bencilaminopurina (Fig.6) y la topolina (Cotelo Morales, 2016).

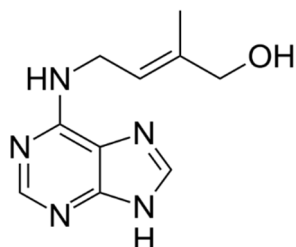


Fig.5: Estructura química de la zeatina
(<https://es.wikipedia.org/wiki/Zeatina>)

La zeatina es la más abundante de las citoquininas naturales, estimula la división celular cuándo se añade al medio de cultivo en combinación con una auxina. La zeatina deriva de las moléculas de adenina o aminopurina (Taiz *et al.*, 2015).

La 6-Bencilaminopurina es una citoquinina natural reguladora del crecimiento de las plantas que muestra estabilidad en soluciones ácidas y alcalinas (Definición adaptada de EcuRed, 2020).

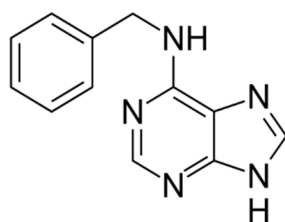


Fig.6: Estructura química de la 6-Bencilaminopurina (BAP)
(<https://es.wikipedia.org/wiki/6-Bencilaminopurina>)

Se ha observado que las citoquininas participan en interacciones huésped-patógeno y que influyen en la resistencia de las plantas ante distintos patógenos, además juegan un papel importante en la coordinación del programa genético que regula la

senescencia de los tejidos de las plantas (Rey Casal, 2016). Además, la BAP tiene semejanza estructural con el pirimetanil y muestra actividad fungicida frente a *Botrytis cinerea* (Cotelo Morales, 2016).

En este trabajo hemos comparado la acción fungicida de la bencilaminopurina (BAP) con la de un fungicida del grupo de las APs (el pirimetanil (PIRI)) en dos aislados de *Botrytis cinerea* con distinta sensibilidad a un fungicida del grupo de las APs (ciprodinil).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Comprobar si la bencilaminopurina inhibe el crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* como el pirimetanil en dos aislados del hongo, uno sensible y otro resistente a ciprodinil.
2. Determinar si la bencilaminopurina inhibe la germinación de conidios de *Botrytis cinerea* como el pirimetanil.
3. Comparar la longitud del tubo de germinación de los conidios de *Botrytis cinerea* incubados con bencilaminopurina o pirimetanil.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material fúngico

Para este experimento vamos a utilizar dos aislados de *Botrytis cinerea* proporcionados por Dolores Fernández Ortuño de la Universidad de Málaga. Los aislados están clasificados según su distinta sensibilidad a *Botrytis cinerea*: B19AR (altamente resistente) y B65S (sensible). Para mantener la actividad y conseguir una mayor esporulación del hongo se hicieron diversos repicados. Esta técnica consistió en hacer cortes de porciones aproximadamente 1 cm² de cada aislado y realizar su siembra a nuevas placas de Petri en un medio PDA (Patata Dextrosa Agar), bajo condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar. Posteriormente las placas se incubaron en una cámara a 23°C en condiciones de oscuridad permanente.

3.2 Estudio del efecto fungicida en el micelio de *Botrytis cinerea*

Se realizó un ensayo para cada uno de los aislados (B19AR y B65S) para estudiar el nivel de inhibición de la bencilaminopurina (BAP) y pirimetanil (PIRI) en el crecimiento de la colonia del micelio. Se realizaron dos experimentos independientes, con cuatro placas por tratamiento en cada experimento. Los tratamientos fueron BAP 50 µM, PIRI 50 µM y control, que se prepararon añadiendo al medio PDA una solución madre de los compuestos disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), siendo la concentración final de DMSO de 0,5% (v/v) en todos los casos. Se tomó un cultivo de *Botrytis cinerea* en PDA de tres días, y se obtuvieron discos de 9 mm con un sacabocados en condiciones estériles. Estos discos se sembraron en cada una de las placas. Posteriormente, las placas se incubaron en una cámara a 23°C en condiciones de oscuridad permanente. A las 72 h se midió el diámetro del crecimiento del micelio tomando dos medidas perpendiculares (*Fig.7*) y se obtuvo la media. En los valores finales se restó el diámetro del disco inicial (9mm).

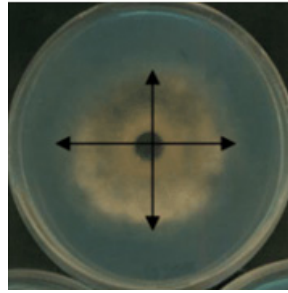


Fig.7: Medidas realizadas de la superficie del micelio de *Botrytis cinerea*.

3.3 Estudio del efecto fungicida en la germinación de conidios de *Botrytis cinerea*

Posteriormente se llevó a cabo otro experimento para comparar el efecto de los dos compuestos sobre la germinación de los conidios del hongo. En este caso se usó solamente el aislado B65S porque presentó mayores diferencias entre ambos compuestos (aunque no significativas) en el experimento con micelio. Para obtener la muestra de conidios se usaron placas de un cultivo de *Botrytis cinerea* en PDA de 5-7 días para que ya estuviesen esporuladas. Se añadieron 5 mL de agua destilada estéril a cada placa y se utilizó un asa de siembra Digralesky para obtener una suspensión de conidios. Luego se añadieron otros 5 mL de agua destilada, y la suspensión se filtró a través de lana de vidrio estéril para eliminar los restos de micelio. Una vez obtenidos los conidios, se centrifugó la suspensión a 1500 xg durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 10 mL de agua destilada estéril. Se repitió el mismo proceso de centrifugado, y se resuspendió el nuevo precipitado en 1 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se hizo un recuento de los conidios en una cámara de Neubauer (Fig. 8) para obtener la concentración de los mismos.

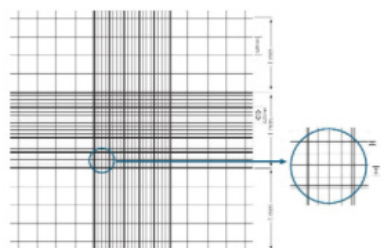


Fig.8: Retículo cámara Neubauer formado por nueve cuadrados de 1 mm² de superficie.

(Fuente: Wikimedia commons, 2020.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ab/Reticulo_Neubauer.jpg)

Después se preparó una suspensión con una concentración de 10^6 conidios/mL, a la que se añadieron los distintos tratamientos: BAP 50 μ M, PIRI 50 μ M y control, que se prepararon añadiendo al medio PDA una solución madre de los compuestos disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), siendo la concentración final de DMSO de 0,5% (v/v) en todos los casos. También se añadió en todos los casos glucosa a una concentración final de 10 mM para favorecer la germinación. Los tratamientos se aplicaron en condiciones de humedad relativa alta y 23°C durante 6h. Tras la incubación, se observaron al microscopio (*Fig.9*), calculando el porcentaje de germinación tras observar 100 conidios por tratamiento, y se midieron los tubos germinativos de 25 conidios por tratamiento. Se realizaron dos experimentos independientes.

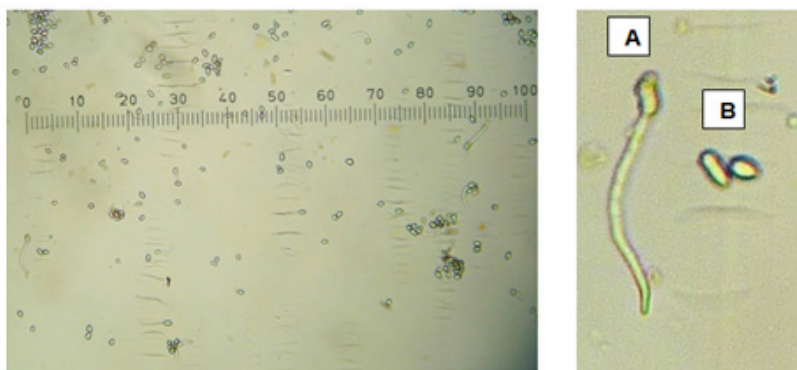


Fig.9: Regleta del microscopio para medir el tubo de germinación de los conidios (izquierda). Conidio germinado con su tubo de germinación (A) y dos conidios no germinados (B) (derecha).

3.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado con los programas Microsoft Office Excel y Statgraphics Centurion XVIII. En el caso de los experimentos con micelio, los datos se analizaron con un ANOVA y un test de Duncan ($\alpha=0,05$). En el caso del porcentaje de germinación los datos se analizaron con una Chi-cuadrado (χ^2). En el caso de la longitud del tubo germinativo, se analizaron por un test de Kruskal-Wallis y un test de Bonferroni.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de la inhibición del crecimiento del micelio del hongo

En las siguientes gráficas se muestran los resultados del crecimiento de los aislados de *Botrytis cinerea* (B65S y B19AR) con distinta sensibilidad a ciprodinil.

En la Figura 10 se observa que el aislado B65S es inhibido significativamente con respecto al control solamente por pirimetanil, mientras que el crecimiento del hongo tratado con bencilaminopurina no muestra diferencias ni con el control ni con el tratamiento con pirimetanil.

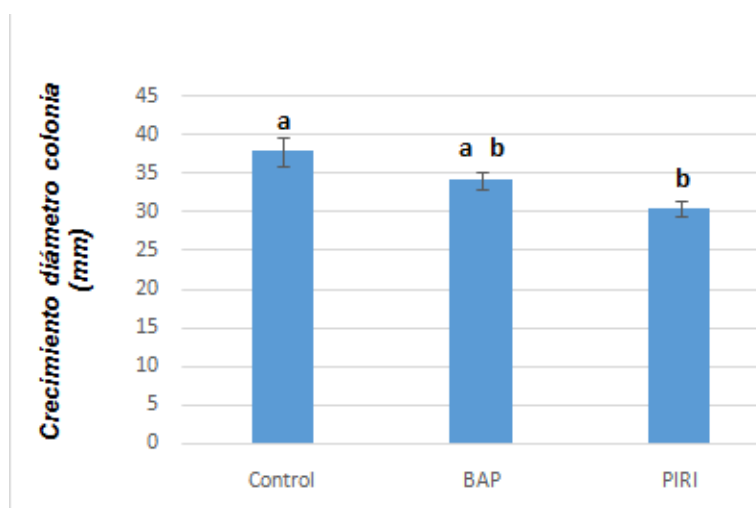


Fig.10. Efecto del tratamiento con BAP (bencilaminopurina) y PIRI (pirimetanil) sobre el diámetro de la colonia del aislado B65S de *Botrytis cinerea*. Se muestran las medias \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en un test ANOVA y un test post-hoc de Duncan.

En la figura 11 se observa que el aislado B19AR es inhibido significativamente con respecto al control tanto por bencilaminopurina como por pirimetanil, sin embargo el crecimiento del hongo no muestra diferencias entre los tratamientos con dichos compuestos.

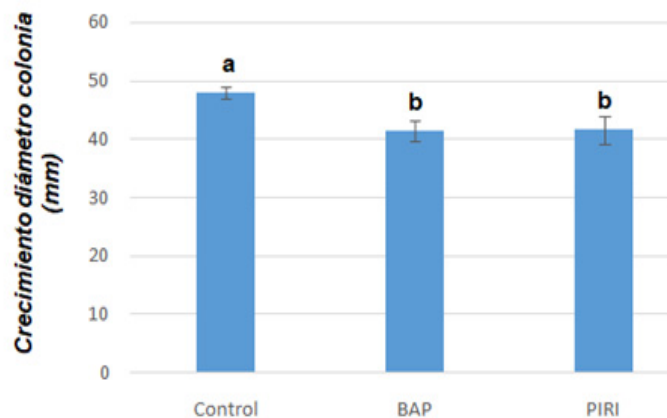


Fig.11. Efecto del tratamiento con BAP (bencilaminopurina) y PIRI (pirimetanil) sobre el diámetro de la colonia del aislado B19AR de *Botrytis cinerea*. Se muestran las medias \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en un test ANOVA y un test post-hoc de Duncan.

4.2. Estudio de germinación de los conidios

Para este estudio se tomaron muestras del aislado B65S de *Botrytis cinerea* que mostraban mayor esporulación para poder ver los conidios en el microscopio y hacer una valoración de los germinados y no germinados (Fig. 12). Dentro de los germinados se hace una medida de su tubo de germinación (Fig. 13).

En la figura 12 se observa que en el aislado B65S el porcentaje de conidios no germinados es significativo con respecto al control solamente por pirimetanil, mientras que el crecimiento del hongo tratado con bencilaminopurina no muestra diferencias con el control.

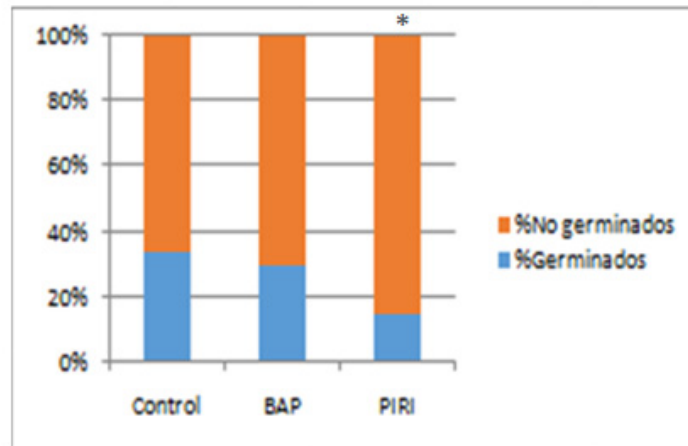


Fig.12: Efecto del tratamiento con BAP (bencilaminopurina) y PIRI (pirimetanil) sobre el porcentaje de germinación en los conidios del aislado B65S de *Botrytis cinerea*. Se muestran los porcentajes de germinados y no germinados. El asterisco indica un resultado significativo con respecto al control en un test Chi-cuadrado.

En la figura 13 se observa que el crecimiento del tubo de germinación del aislado B65S es inhibido significativamente con respecto al control tanto por bencilaminopurina como por pirimetanil. Sin embargo, no muestra diferencias entre los tratamientos con dichos compuestos.

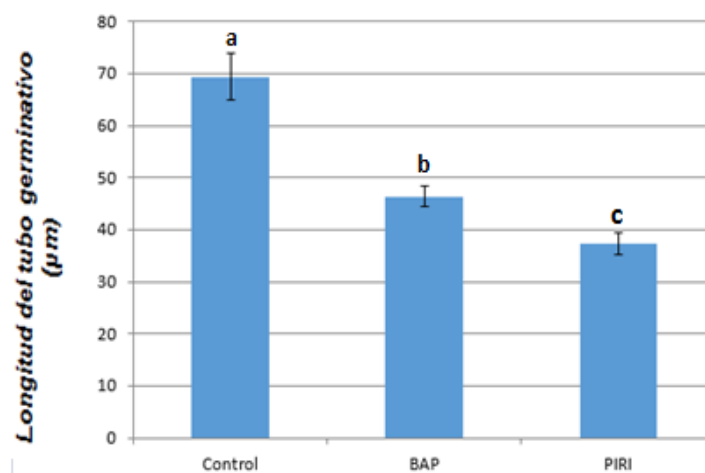


Fig.13: Efecto del tratamiento con BAP (bencilaminopurina) y PIRI (pirimetanil) sobre el tubo de germinación del aislado B65S de *Botrytis cinerea*. Se muestran las medias \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en un test Kruskal-Wallis y un test Bonferroni.

5. DISCUSIÓN

Tras la realización del análisis estadístico se puede observar en los resultados como el tratamiento con bencilaminopurina y con pirimetanil causó una ligera inhibición en el crecimiento del micelio de ambos aislados de *Botrytis cinerea*. En el caso del aislado B65S parece haber una diferencia entre los tratamientos con bencilaminopurina y con pirimetanil, pero no es significativa, tal vez debido al tamaño muestral. En cuanto a los resultados que se obtuvieron del estudio de germinación de los conidios, se sugiere que tanto BAP como PIRI inhiben de manera notable la germinación de los conidios y el desarrollo del tubo de germinación. En general, se puede observar cómo es más efectivo el tratamiento con pirimetanil ya que el aislado B65S muestra sensibilidad a ciprodinil. En anteriores estudios (Leroux *et al.*, 2002) se ha descrito que la actividad de los fungicidas reside principalmente en el bloqueo de la germinación de los conidios. Esto es debido a que se frena la producción de varias enzimas que contienen glutatión que están implicadas en la germinación de la espora. Además, las anilino pirimidinas son inhibidoras de la biosíntesis de metionina y se ha demostrado que inhiben la elongación del tubo de germinación y el desarrollo micelial del hongo *Botrytis cinerea*. En otros estudios (Sharma *et al.*, 2010), se realizaron experimentos para comprobar el efecto de la 6-bencilaminopurina en otros hongos patógenos como *Leptosphaeria maculans* y *Alternaria brassicae*. Se observó como BAP es más efectiva que otras citoquininas ya que es capaz de disminuir de manera notable el crecimiento del micelio. Sin embargo, otras citoquininas como la quinetina y el hemisulfato de adenina no inhibieron el crecimiento del hongo. Esto es indicativo de que el poder de inhibición reside en el anillo benceno que contiene BAP. La BAP tiene cierta analogía estructural con los benzimidazoles, un tipo de fungicidas que interfieren en el citoesqueleto fúngico afectando al ensamblaje de la subunidad de β -tubulina (Hahn, 2014; Jurick *et al.*, 2017; Kretschmer *et al.*, 2009). Las anilino pirimidinas modifican la síntesis de aminoácidos y la secreción de proteínas (Hahn, 2014). El efecto de pirimetanil es más notable en la germinación de los conidios y en la elongación del tubo de germinación que en la tasa de crecimiento del micelio (Tian *et al.*, 2019) tal y como se observa en los resultados obtenidos. Se ha demostrado que tanto el crecimiento del micelio como la germinación del conidio de *Botrytis cinerea* representan

un papel muy importante en el proceso de infección. El micelio es en muchos casos el inóculo inicial y a partir de él se forman los conidióforos que contienen los conidios. Estos conidios pueden diseminarse a grandes distancias e infectar las plantas (Tian *et al.*, 2019). Por ello, es muy importante el uso de fungicidas químicos que disminuyan notablemente el crecimiento del hongo y su germinación.

6. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓNS/CONCLUSIONS

En función de los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. El crecimiento del micelio del aislado B19AR fue inhibido tanto por bencilaminopurina como por pirimetanil. El aislado B65S fue inhibido por pirimetanil, pero no por bencilaminopurina.
2. El pirimetanil inhibió la germinación de los conidios del aislado B65S, mientras que la bencilaminopurina no.
3. Tanto el tratamiento con bencilaminopurina como con pirimetanil inhiben de manera significativa en el crecimiento del tubo germinativo en el aislado B65S, pero el pirimetanil es más efectivo.

En función dos resultados obtidos podemos concluir que:

1. O crecemento do micelio do illado B19AR foi inhibido tanto por bencilaminopurina como por pirimetanil. O illado B65S foi inhibido por pirimetanil, pero non por bencilaminopurina.
2. O pirimetanil inhibiu a xerminación dos conidios do illado B65S, mentres que a bencilaminopurina non.
3. Tanto o tratamento con bencilaminopurina como con pirimetanil inhiben de maneira significativa no crecemento do tubo xerminativo no illado B65S, pero o pirimetanil é máis efectivo.

According to the results obtained, we can conclude that:

1. The mycelial growth of isolate B19AR was inhibited by both benzylaminopurine and pyrimethanil. Isolate B65S was inhibited by pyrimethanil, but not by benzylaminopurine.
2. Pyrimethanil inhibited the germination of the conidia of isolate B65S, whereas benzylaminopurine did not.
3. Both benzylaminopurine and pyrimethanil treatment significantly inhibit germ tube growth in isolate B65S, but pyrimethanil is more effective.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Benito, E., Arranz, M. y Eslava, A.** (2000). Revisión Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana Micología* 17: 43-46.
2. **Cotelo Morales, M.** (2016). Propiedades de la bencilaminopurina para el control de *Botrytis cinerea* en judía: actividad fungicida e inducción de resistencia. Trabajo fin de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad da Coruña.
3. **EcuRed.** <https://www.ecured.cu/6-N-Bencilaminopurina> [03-08-2020]
4. **Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Denle, N.** (2007). *Botrytis: biology, pathology and control*. **Kluwer Academic Publishers. Springer.**
5. **Espinosa de los Monteros, M. C.** (2006). Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Fisiología y Genética. Universidad de Cádiz.

6. **Fan, F., Hamada, M.S., Li, N., Li, G.Q. y Luo, C.X.** (2017). Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse strawberries in Hubei Province, China. *Plant Disease* 101: 601-606.
7. **Faretra, F. y Pollastro, S.** (1991). Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* 95: 943-951.
8. **Fedele, G., Bove, F., González-Domínguez, E. y Rossi, V.** (2020). A generic model accounting for the interactions among pathogens, host plants, biocontrol agents and the environment, with parametrization for *Botrytis cinerea* on grapevines. *Agronomy* 10: 222.
9. **Fernández-Ortuño, D., Chen, F. y Schnabel, G.** (2013). Resistance to ciprodinil and lack of fluodioxinil resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry in north and South Carolina. *Plant Disease* 97: 81-85.
10. **Fournier, E., Gladieux, P. y Giraud, T.** (2012). The 'Dr Jekyll and Mr Hyde fungus': noble rot versus gray mold symptoms of *Botrytis cinerea* on grapes. *Evolutionary applications*. 6: 960-969.
11. **Hahn, M.** (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology* 7: 133-141.
12. **Jurick, W. M., Macarisin, O., Gaskins, V.L., Park, E., Yu, J., Janisiewicz, W. y Peter, K.A.** (2017). Characterization of postharvest fungicide-resistant *Botrytis cinerea* isolates from commercially stored apple fruit. *Phytopathology* 107: 363-368.

13. **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: 570.
14. **Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A.S, Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H.J., Pradier, J.M., Leroux, P., De Waard, M.A. y Hahn, M.**(2009). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens* 5: e1000696.
15. **Latorre, B.A., Elfar, K. y Ferrada, E.E.** (2015). Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 42: 305-330.
16. **Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M. y Chapeland, F.** (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*. 58: 876-888.
17. **Leroux, P.** (2007). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In *Botrytis: Biology, pathology and control*. **Kluwer Academic Publishers. Springer.**
18. **Mosbach, A., Edel, D., Farmer, A.D., Widdison, S., Barchietto, T., Dietrich, R.A., Corran, A. y Scalliet, G.** (2017). Anilinopyrimidine resistance in *Botrytis cinerea* is linked to mitochondrial function. *Frontiers in Microbiology*. 8:2361.
19. **Petrasch, S., Knapp, S.J., van Kan, J.A.L. y Blanco-Ulate, B.** (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 20: 877-892.

20. **Rey Casal, C.** (2016). Ensayo del etileno y de una citoquinina como posibles fitosanitarios frente a *Botrytis cinerea* en la planta ornamental *Zinnia elegans*. Trabajo fin de máster. Facultad de Ciencias. Universidad de A Coruña.
21. **Rios Velasco, C., Caro Cisneros, J.M., Berlanga Reyes, D.I., Ruiz Cisneros, M.F., Ornelas Paz, J.J., Salas Marina, M.A., Villalobos Pérez, E. Guerrero Prieto, V.M.** (2016). Identificación y actividad antagónica *in vitro* de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. Contra hongos fitopatógenos comunes. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 84-99.
22. **Rosero-Hernández, E.D., Moraga, J., Collado, I.G. y Echeverri, F.** (2019). Natural compounds that modulate the development of the fungus *Botrytis cinerea* and protect *Solanum lycopersicum*. *Plants* 8: 111.
23. **Sharma, N., Rahman, M.H., Liang, Y. y Kav, N.N.V.** (2010). Cytokinin inhibits the growth of *Leptosphaeria maculans* and *Alternaria brassicae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 32: 306-314.
24. **South, K.A., Peduto Hand, F. y Jones, M.L.** (2020). Beneficial bacteria identified for the control of *Botrytis cinerea* in petunia greenhouse production. *Plant Disease* 104: 1801-1810.
25. **Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M. y Murphy, A.**(2015). *Plant physiology and development*. Sixth Edition. Sinauer Associates.
26. **Tian, Y., Che, Z., Sun, D., He, J., Liu, S. y Lin, X.** (2019). In vitro effects of five different clases of fungicides on growth and development of *Botrytis cinerea* isolated from tree peony in China. *HortScience* 54: 1984-1988.

27. **van Kan, J. A. L.** (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11: 247–253.
28. Veloso, J., Alabouvette, C., Olivain, C., Flors, V., Pastor, V., García, T. y Díaz, J. (2016). Modes of action of the protective strain Fo47 in controlling verticillium wilt of pepper. *Plant Pathology* 65: 997–1007.
29. **Veloso, J., & van Kan, J.A.L.** (2018). Many shades of grey in *Botrytis*–host plant interactions. *Trends in Plant Science* 23: 613-622.
30. **Wang, H-C., Li, L-C., Cai, B., Cai, L-T., Chen, X-J., Yu, Z-H. y Zhang, C-Q.** (2018). Metabolic phenotype characterization of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Frontiers in Microbiology* 9: 470.
31. **Wikipedia.** <https://www.wikipedia.org/> [03-08-2020]
32. **Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J.A.L.** (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8: 561-580.
33. **Xu, D., Yu, G., Xi, P., Kong, X., Wang, Q., Gao, L. y Jiang, Z.** (2018). Synergistic effects of resveratrol and pyrimethanil against *Botrytis cinerea* on grape. *Molecules* 23: 1455.