



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Caracterización de las propiedades fitosanitarias de
complejos de Zn y sus ligandos**

**Caracterización das propiedades fitosanitarias de
complexos de Zn e os seus ligandos**

**Characterization of the phytosanitary properties of Zn
complexes and their ligands**

Andrea Rodríguez Montes

Curso: 2019 - 2020. Convocatoria: setembro

***Directores: José Díaz Varela
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 ANDREA RODRÍGUEZ MONTES e titulado

“Caracterización de las propiedades fitosanitarias de complejos de Zn y sus ligandos”

“Caracterización das propiedades fitosanitarias de complexos de Zn e os seus ligandos”

“Characterization of the phytosanitary properties of Zn complexes and their ligands”

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.....	1
RESUMO	2
SUMMARY	3
1. CONTENIDO DEL PROYECTO: ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA.....	4
1.1. Lucha contra hongos patógenos de plantas	4
1.2. Planta huésped: <i>Solanum lycopersicum</i> L.	4
1.3. Hongo patógeno: <i>Botrytis cinerea</i>	6
1.4. Resistencia inducida	8
1.5. Fungicidas basados en la piridina.....	8
1.6. Hidrazonas, tiosemicarbazonas y sus complejos derivados.....	9
1.7. Compuestos a ensayar	11
2. CONTENIDO DEL PROYECTO: OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	12
3. CONTENIDO DEL PROYECTO: PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS	12
4. VIABILIDAD DEL PROYECTO: METODOLOGÍA	13
4.1. Material biológico	13
4.2. Compuestos a ensayar	13
4.3. Ensayo de actividad fungicida en placa	13
4.4. Ensayo de eficacia de los compuestos en planta	14
4.4.1. Tratamiento	15
4.4.2. Inoculación	15
4.4.3. Determinación de síntomas.....	16
4.4.4. Estudio de fitotoxicidad.....	16
4.4.5. Optimización del tratamiento más efectivo.....	16
4.5. Ensayo de expresión génica	17
4.5.1. Recogida y preparación de muestras.....	17

4.5.2. Extracción de RNA y obtención de cDNA	17
4.5.3. Análisis por q-PCR	18
5. VIABILIDAD DEL PROYECTO: PLAN DE TRABAJO	19
6. ESTIMACIÓN PRESUPUESTARIA.....	20
7. IMPLICACIONES ÉTICAS Y/O DE BIOSEGURIDAD	21
CONCLUSIONES O HITOS QUE SE PRETENDEN ALCANZAR	22
CONCLUSIÓNS OU FITOS QUE SE PRETENDEN ACADAR.....	22
CONCLUSIONS OR MILESTONES TO BE ACHIEVED.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	24

RESUMEN

El hongo patógeno *Botrytis cinerea* causa considerables pérdidas económicas en más de 200 especies de cultivo, entre las que se encuentra el tomate. Actualmente, el control de este patógeno supone un importante desafío, ya que *B. cinerea* ha desarrollado resistencia contra un gran número de fungicidas comerciales. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de encontrar nuevos compuestos fitosanitarios que resulten efectivos, así como de desarrollar métodos de gestión complementarios al control químico.

Atendiendo a las propiedades de los compuestos piridínicos, en el presente proyecto se proponen diferentes ensayos con la finalidad de caracterizar el potencial fitosanitario de seis compuestos derivados de la piridina: dos ligandos bases de Schiff, una hidrazona y una tiosemicarbazona, y sus respectivos complejos de zinc(II). De esta forma, se pretende evaluar su capacidad de control ante *B. cinerea* tanto por acción fungicida como por inducción de resistencia en la planta de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Para ello, se realizarán ensayos del efecto fungicida en placa y eficacia en planta, junto con el estudio de la expresión de dos genes implicados en la defensa de la planta frente a patógenos (*PAL* y *PR1a*).

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, fitosanitario, fungicida, hidrazona, piridina, resistencia, tiosemicarbazona, tomate, zinc.

RESUMO

O fungo patóxico *Botrytis cinerea* causa considerables perdas económicas en máis de 200 especies de cultivo, entre as que se atopa o tomate. Actualmente, o control deste patóxico supón un importante desafío, xa que *B. cinerea* desenvolveu resistencia contra un gran número de fungicidas comerciais. Este feito pon de manifesto a necesidade de atopar novos compostos fitosanitarios, así como de desenvolver métodos de xestión complementarios ao control químico.

Atendendo ás propiedades dos compostos piridínicos, no presente proxecto propóñense diferentes ensaios coa finalidade de caracterizar o potencial fitosanitario de seis compostos derivados da piridina: dous ligandos bases de Schiff, unha hidrazona e unha tiosemicarbazona, e os seus respectivos complexos de zinc(II). Desta forma, preténdese avaliar a súa capacidade de control ante *B. cinerea* tanto por acción fungicida como por indución de resistencia na planta de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Para iso, realizaranse ensaios do efecto fungicida en placa e eficacia en planta, xunto co estudo da expresión de dous xenes implicados na defensa da planta fronte a patóxenos (*PAL* e *PR1a*).

Palabras chave: *Botrytis cinerea*, fitosanitario, fungicida, hidrazona, piridina, resistencia, tiosemicarbazona, tomate, zinc.

SUMMARY

The pathogenic fungus *Botrytis cinerea* causes significant economic losses in more than 200 crop species, including tomato. Currently, the control of this pathogen represents an important challenge, since *B. cinerea* has developed resistance against a large number of commercial fungicides. This fact highlights the need to find new effective phytosanitary compounds and develop complementary management methods to chemical control.

Considering the properties of pyridine compounds, in this project different tests are proposed in order to characterize the phytosanitary potential of six compounds derived from pyridine: two Schiff base ligands, one hydrazone and one thiosemicarbazone, and their respective zinc(II) complexes. Thus, our aim is to test their control properties against *B. cinerea* by means of fungicidal action and induction of resistance in tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.). To that end, both fungicidal activity tests on Petri dish and efficacy assays *in planta* will be carried out, as well as the study of the expression of two tomato genes related to plant defence against pathogens (*PAL* and *PR1a*).

Keywords: *Botrytis cinerea*, fungicide, hydrazone, phytosanitary, pyridine, resistance, thiosemicarbazone, tomato, zinc.

1. CONTENIDO DEL PROYECTO: ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA

1.1. Lucha contra hongos patógenos de plantas

La necesidad de satisfacer la creciente demanda de alimentos a nivel mundial de manera eficaz y sostenible es uno de los mayores desafíos a los que nos enfrentamos en la actualidad.

Se estima que entre el 20 y el 40% de la producción mundial de cultivos se pierde cada año debido a la acción plagas y enfermedades (Villa *et al.*, 2017). Las enfermedades de las plantas son causadas por una gran variedad de organismos, como virus, bacterias, nematodos, plantas parásitas u hongos, constituyendo estos últimos el mayor grupo de patógenos en cultivos (Agris, 2005).

Desde el descubrimiento de los primeros fungicidas en la segunda mitad del siglo XIX, el control de plagas y enfermedades de plantas cultivadas ha dependido enormemente del uso de productos fitosanitarios (Agris, 2005). Sin embargo, el desarrollo de resistencia a pesticidas en patógenos y plagas, las regulaciones restrictivas, así como la preocupación por el impacto de estos productos sobre la salud humana y el medio ambiente, han impulsado la búsqueda de métodos alternativos, más eficientes y sostenibles, para la gestión de los cultivos. De esta forma, el control químico es solo un componente de un enfoque integrado que busca coordinar diferentes estrategias, como la aplicación de prácticas culturales, el uso de variedades de plantas resistentes, el control químico o el control biológico, entre otras (Villa *et al.*, 2017).

1.2. Planta huésped: *Solanum lycopersicum* L.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta perenne de porte arbustivo perteneciente a la familia Solanaceae. Se trata de una especie de gran importancia económica y ampliamente cultivada en todo el mundo. Actualmente se dedican cerca de 5 millones de hectáreas en el planeta al cultivo de tomate para su comercialización en fresco, cuya producción asciende a 180 millones de

toneladas anuales (*Figura 1*). Asia concentra el 61,3% de la producción global, mientras que la producción europea representa tan solo un 12,8% del total (FAOSTAT, 2018).

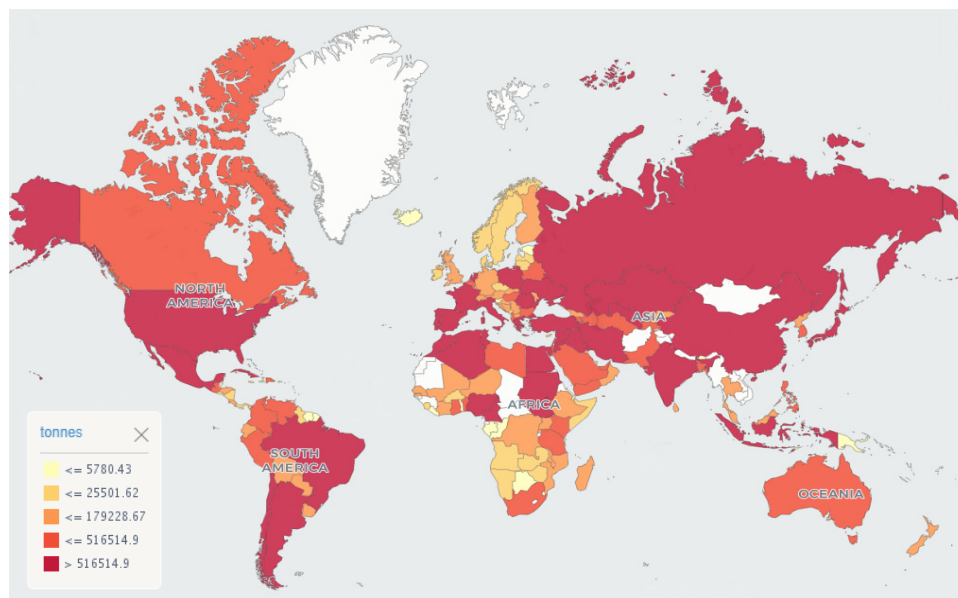


Figura 1. Producción media de tomate para su comercialización en fresco en el mundo (1998-2018). Fuente: FAOSTAT (2018).

España es el octavo productor mundial de tomate para su comercialización en fresco, generando cerca de 5 millones de toneladas cada año (*Figura 2*) (FAOSTAT, 2018).

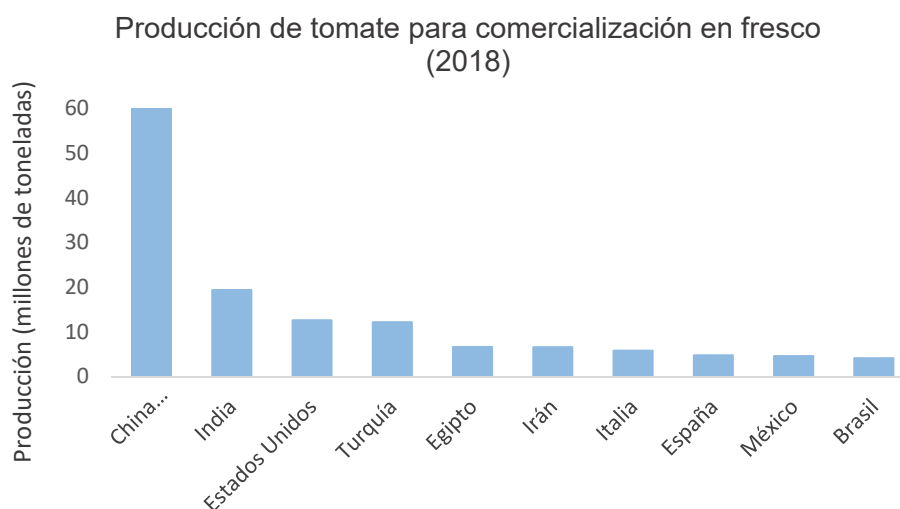


Figura 2. Principales productores de tomate del mundo. Fuente: adaptado de FAOSTAT (2018).

El tomate presenta un rápido periodo de crecimiento, de 90 a 150 días, y su desarrollo óptimo se obtiene con temperaturas diurnas de 18-25°C y nocturnas de 10-20°C, siendo muy sensible a las heladas. Puede crecer en una amplia variedad de suelos, pero son preferibles sustratos bien drenados y de salinidad moderada. Los climas secos son los más indicados para su cultivo, dado que una humedad elevada conduce a una mayor incidencia de plagas y enfermedades (FAO, 2020).

1.3. Hongo patógeno: *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers.:Fr. [teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel] es un hongo fitopatógeno que afecta a 586 géneros de plantas y causa importantes pérdidas económicas en más de 200 especies de cultivo, como el tomate, la vid o la fresa (Fillinger & Elad, 2016).

Su desarrollo se ve favorecido en condiciones de humedad elevada, por lo que el cultivo de plantas en invernaderos aumenta considerablemente el riesgo de infección, especialmente en el caso del tomate. Además, puede crecer eficazmente a temperaturas inmediatamente por encima del punto de congelación en frutas como el kiwi, la manzana o la pera (Williamson *et al.*, 2007).

Aunque *B. cinerea* causa una amplia variedad de síntomas, el más típico es la podredumbre de todas las partes áreas de la planta, así como de frutos y flores postcosecha, seguida de una rápida aparición de masas grises de conidios (Figura 3) (Williamson *et al.*, 2007).



Figura 3. Rama (izq) y fruto (dcha) de tomate afectado por *Botrytis cinerea*. Fuente: <http://blogs.cornell.edu/livegpath/gallery/tomato/tomato-gray-mold/>.

Este hongo es comúnmente considerado un patógeno necrotrofo, es decir, que ataca los tejidos hasta producir su muerte, obteniendo nutrientes a partir de ellos. Sin embargo, *B. cinerea* no es una especie estrictamente necrotrofa, ya que se ha observado su capacidad de colonización como endófito facultativo. De esta forma, el patógeno puede pasar por una fase biotrófica asintomática, sin inducir daños en la planta huésped, seguida por un desarrollo necrotrófico cuando esta florece o entra en senescencia, provocando un rápido deterioro de los tejidos infectados (Veloso & van Kan, 2018).

En las etapas iniciales de la infección, *Botrytis* produce sRNAs y proteínas efectoras para suprimir la respuesta inmune en la planta huésped, lo que le permite establecerse y acumular biomasa antes de entrar en la fase necrotrófica (Veloso & van Kan, 2018). En este punto, el hongo comienza a producir moléculas efectoras que inducen la apoptosis, como toxinas y enzimas implicadas en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, puede secretar ácido oxálico, que estimula la actividad de pectinasas, lacasas y proteasas, así como otras enzimas que degradan las paredes celulares, facilitando su penetración en los tejidos (Petrasch *et al.*, 2019).

Actualmente, el control de este patógeno se basa principalmente en el uso de productos agroquímicos. Sin embargo, debido a su plasticidad genética y su gran capacidad de reproducción asexual a través de conidios, así como por la aplicación excesiva de estos productos, *B. cinerea* ha desarrollado resistencia contra un gran número de fungicidas comúnmente usados. Además, en los últimos años se ha detectado una creciente incidencia de cepas multirresistentes (Fernández-Ortuño *et al.*, 2013; Rupp *et al.*, 2017), lo que supone un serio problema para la protección de cultivos como el del tomate (Liu *et al.*, 2016).

Todo ello pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos compuestos fungicidas, así como de reducir el peso del control químico en la gestión de este patógeno.

1.4. Resistencia inducida

La inducción de resistencia constituye una de las estrategias más prometedoras para la reducción del uso de fungicidas. Esta consiste en la estimulación y/o potenciación de las respuestas defensivas de la planta mediante el uso de elicitores, como compuestos químicos o microorganismos (Delaunois *et al.*, 2014).

Existen dos tipos principales de resistencia inducida: resistencia sistémica adquirida (SAR) y resistencia sistémica inducida (ISR). La SAR puede ser inducida por la infección de patógenos necrotrofos o por el tratamiento con diferentes compuestos químicos, como el acibenzolar-S-metil (ASM), mientras que la ISR se desarrolla tras la colonización de las raíces por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Walters *et al.*, 2013).

La detección de las moléculas elicitoras conduce a la activación de mecanismos implicados en la defensa de la planta, como la producción de ROS, la acumulación de proteínas PR o el reforzamiento de la pared celular (Walters & Fountaine, 2009)

A pesar de que muchos compuestos han dado buenos resultados en condiciones de laboratorio, a día de hoy la eficacia de los inductores de resistencia en campo es relativamente baja y no puede competir con el uso de pesticidas. Esto se debe a que la resistencia inducida es una respuesta de la planta huésped, por lo que está condicionada por diversos factores, como el genotipo de la planta o las condiciones del medio (Walters & Fountaine, 2009). No obstante, existen ejemplos de eficacia en cultivos, como es el caso del estudio de Bellée *et al.* (2018), en el que se demostró la efectividad del compuesto fungicida comercial pirimetanil como inductor de resistencia en vid.

1.5. Fungicidas basados en la piridina

Los derivados de la piridina son importantes compuestos heterocíclicos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Muchos de ellos, tanto naturales como sintéticos, muestran una amplia variedad de actividades

biológicas, como antifúngicos, antivíricos, insecticidas o herbicidas (Wan *et al.*, 2018). Además, en comparación con otros compuestos similares, como los derivados de benceno, los compuestos piridínicos presentan una menor constante hidrofóbica, lo que les proporciona una mayor bioactividad y selectividad, así como una menor toxicidad (Guan *et al.*, 2016).

Por todo ello, este tipo de compuestos son ampliamente utilizados como productos fitosanitarios, incluyendo fungicidas empleados en el control de *B. cinerea* (Figura 4). No obstante, este patógeno ha desarrollado resistencia contra algunos de ellos, entre los que se encuentra el boscalid (Rupp *et al.*, 2017).

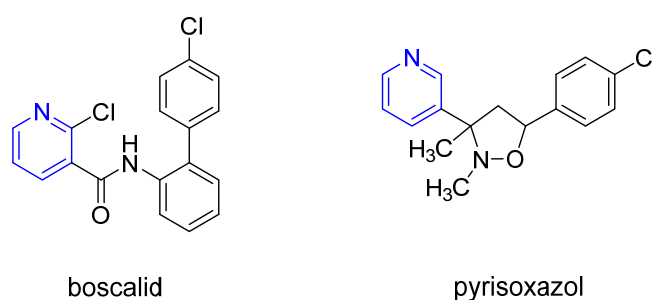


Figura 4. Estructura de boscalid y pyrisoxazol, dos fungicidas derivados de la piridina empleados en el tratamiento de *B. cinerea*. Fuente: elaboración propia.

1.6. Hidrazonas, tiosemicarbazonas y sus complejos derivados

Atendiendo a las propiedades de los compuestos piridínicos, en este proyecto se plantea el estudio de diferentes compuestos orgánicos que presentan un anillo de piridina en su estructura. Concretamente se ensayarán dos tipos de ligandos bases de Schiff, hidrazonas y tiosemicarbazonas (Figura 5), así como sus complejos metálicos derivados.

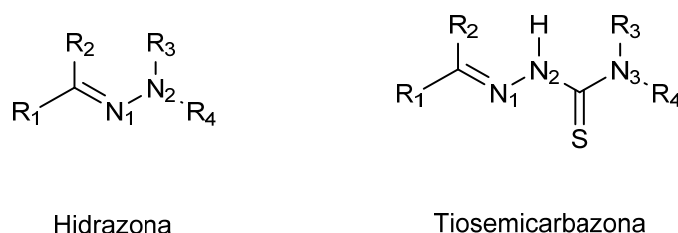


Figura 5. Estructura general de una hidrazona y una tiosemicarbazona. Fuente: elaboración propia.

Gracias al carácter nucleofílico de sus átomos de nitrógeno y azufre, hidrazonas y tiosemicarbazonas pueden actuar como agentes quelantes ante metales de transición como Ru, Fe, Cu o Zn, dando lugar a compuestos de coordinación. Estas bases de Schiff son ligandos muy versátiles, dado que pueden unirse a los centros metálicos en su forma neutra o iónica y a través de diferentes posiciones de coordinación (*Figura 6*).

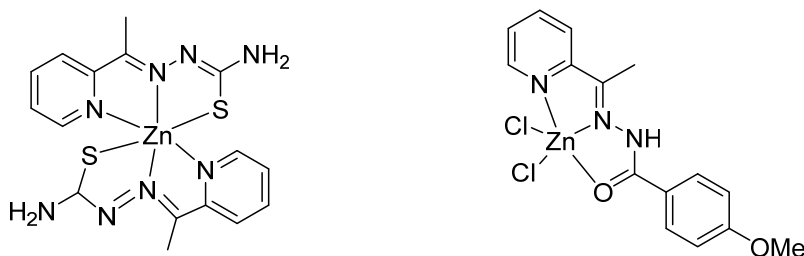


Figura 6. Ejemplos de complejos metálicos con ligandos tiosemicarbazona (izq) e hidrazona (dcha). Fuente: elaboración propia.

Las tiosemicarbazonas e hidrazonas, especialmente las heterocíclicas, y sus complejos derivados presentan una amplia variedad de aplicaciones biológicas, pudiendo actuar como antitumorales, antibacterianos, antivíricos o antifúngicos (Beraldo & Gambino, 2005; Verma *et al.*, 2014). En muchos casos, las propiedades biológicas de los complejos difieren de las de los ligandos o iones metálicos libres. Así, los compuestos de coordinación pueden ser más activos o incluso exhibir propiedades que no se encuentran en los ligandos libres, a la vez que se reducen efectos secundarios adversos. Además, se ha observado que la complejación modifica el comportamiento lipófilo de los compuestos, facilitando su transporte al interior celular a través de las membranas lipídicas (Kovala-Demertzi *et al.*, 2006).

En los últimos años, se han publicado diferentes estudios sobre el potencial de algunas tiosemicarbazonas y sus complejos derivados como productos fitosanitarios y de control alimentario, basados en su actividad contra hongos fitopatógenos (Degola *et al.*, 2015; Zani *et al.*, 2017; Rogolino *et al.*, 2017). Por otra parte, se han realizado ensayos con diferentes bases de Schiff, entre ellas hidrazonas combinadas con anillos de piridina, en los que estos compuestos mostraron una excelente actividad contra *Botrytis cinerea* (Wei *et al.*, 2019).

1.7. Compuestos a ensayar

El presente proyecto plantea el estudio de la potencial actividad fitosanitaria de dos ligandos, una tiosemicarbazona (**A**) y una hidrazona (**D**), y sus respectivos complejos derivados de zinc(II) (**A1**, **A2**, **D1** y **D2**) (Figura 7), sintetizados en el grupo de investigación QUIMOLMAT de la Universidade da Coruña (UDC) (Rodríguez Montes, 2020).

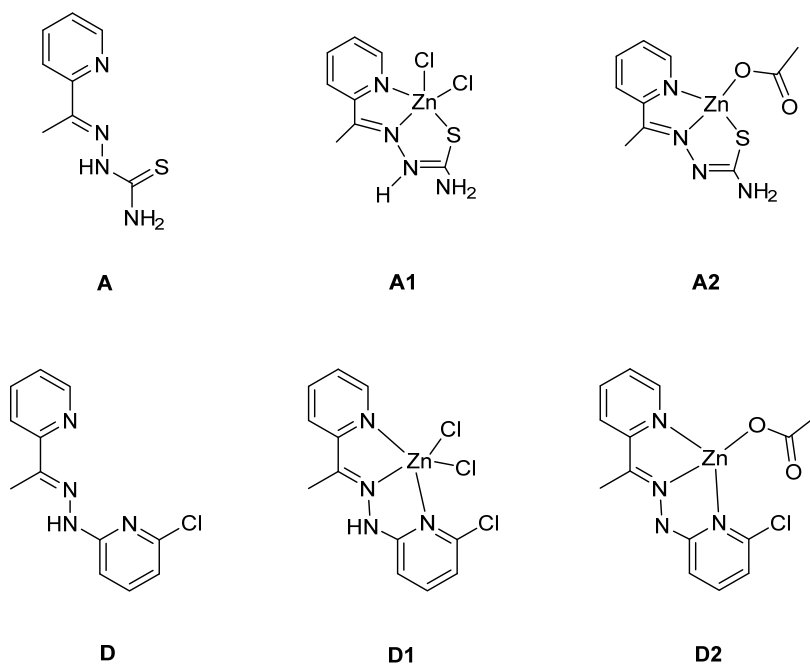


Figura 7. Estructura de los ligandos **A** y **D** y sus complejos derivados **A1**, **A2**, **D1** y **D2**. Fuente: elaboración propia.

En un estudio realizado por Kasuga *et al.* (2003), el ligando **A** y sus complejos derivados mostraron capacidad antimicrobiana contra bacterias y hongos. La tiosemicarbazona **A** presentó una actividad moderada contra las bacterias *B. subtilis* y *P. aeruginosa*, así como contra la levadura *C. albicans*. El complejo derivado **A2** resultó además muy efectivo contra *S. aureus*, mientras que el complejo **A1** mostró una actividad moderada contra el hongo *P. citrinum*.

Por otra parte, dos hidrazonas estructuralmente similares al ligando **D** tuvieron éxito ante *B. cinerea* actuando ambas como fungicidas y una de ellas como inductora de resistencia en planta de judía (Villar Martínez, 2018; Núñez Fernández, 2019).

2. CONTENIDO DEL PROYECTO: OBJETIVOS DEL PROYECTO

1. Evaluación de la actividad fungicida de sustancias piridínicas en un cultivo puro de *B. cinerea*.

2. Evaluación de la eficacia local y sistémica de sustancias piridínicas contra *B. cinerea* en planta de tomate.

3. Estudio del efecto inductor de resistencia de sustancias piridínicas en planta de tomate.

3. CONTENIDO DEL PROYECTO: PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS

La difusión de los resultados obtenidos se llevará a cabo a través de cuatro vías principales:

1. Publicación de un Trabajo de Fin de Máster (TFM), que estará disponible en el Repositorio Institucional de la Universidade da Coruña (RUC).

2. Participación en congresos y simposios de índole nacional e internacional, como los organizados por la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV) o la Federación Europea de Sociedades de Biología Vegetal (FESPB).

3. Publicación de artículos científicos en revistas JCR de temática química y/o agronómica, como *Journal of Inorganic Biochemistry*, *Plant Pathology* o *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

4. Participación en cursos y jornadas de carácter divulgativo y formativo, especialmente en aquellos dirigidos a productores agrícolas.

4. VIABILIDAD DEL PROYECTO: METODOLOGÍA

4.1. Material biológico

Los ensayos se realizarán con *Solanum lycopersicum* L. cv Moneymaker. Las semillas se sembrarán en un sustrato de vermiculita humedecido con solución nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). Siguiendo el procedimiento empleado por Díaz *et al.* (2002), de uno a dos días tras la germinación, las plántulas se trasplantarán a un sustrato mezcla de tierra:vermiculita (3:1 [v/v]) y se regarán con agua del grifo. Todo el proceso se llevará a cabo en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16h de luz a una temperatura de 25°C y 8h de oscuridad a 18°C.

Como material fúngico se empleará el aislado B05.10 de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., proporcionado por el Dr. Jan van Kan (Wageningen University, Países Bajos). Este se mantendrá mediante replicados periódicos en medio PDA (Patata Dextrosa Agar) y en condiciones de oscuridad permanente a 23°C hasta el momento de la inoculación.

4.2. Compuestos a ensayar

Se ensayarán dos ligandos, una tiosemicarbazona (**A**) y una hidrazona (**D**), y dos complejos metálicos derivados de cada uno de ellos (**A1**, **A2**, **D1** y **D2**). Todos los compuestos fueron sintetizados y caracterizados en el grupo de investigación QUIMOLMAT de la Universidade da Coruña (UDC) (Rodríguez Montes, 2020).

4.3. Ensayo de actividad fungicida en placa

Los compuestos se disolverán en una mezcla de etanol:agua (1:1 [v/v]), calentando ligeramente para favorecer la disolución. A partir de estas disoluciones madre, se prepararán diluciones seriadas y se añadirá un volumen fijo a cada medio PDA, de forma que las concentraciones finales de los

compuestos en placa sean 2 μM , 10 μM , 50 μM y 150 μM . Estas concentraciones están basadas en estudios previos realizados en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la UDC en planta de judía (datos no publicados) y se ajustarán en función de los resultados obtenidos en el ensayo inicial. Se utilizará como control un medio PDA con una solución etanol:agua (1:1000 [v/v]), dado que esta será la concentración final de etanol en el medio PDA en todos los tratamientos con los compuestos. Para cada uno de los compuestos a ensayar, se realizarán 4 réplicas de cada concentración.

Empleando un sacabocados de 5 mm de diámetro, se obtendrán discos de micelio de un cultivo del patógeno de 3 días y se transferirán al nuevo medio de cultivo, de forma que el micelio quede en contacto directo con este. Las placas se mantendrán en condiciones de oscuridad a 23°C.

La toma de datos se llevará a cabo a las 48 y 72 h tras el inicio del cultivo. Para ello, se realizarán dos medidas perpendiculares del diámetro del micelio utilizando un calibre digital y se restarán 5 mm correspondientes al micelio inicial. Los datos obtenidos se compararán con el control y se calculará el porcentaje de inhibición en cada caso. Estos datos se emplearán para el cálculo del parámetro ED₅₀ (dosis efectiva que produce una inhibición del 50% en el crecimiento del micelio) a partir de la recta de regresión que se obtiene al representar el porcentaje de inhibición de *B. cinerea* frente al logaritmo decimal de la concentración.

Todos los ensayos se realizarán por triplicado de forma independiente.

4.4. Ensayo de eficacia de los compuestos en planta

Para los ensayos de eficacia en planta de tomate, se utilizarán plantas de estado fenológico de dos hojas verdaderas y se dividirán en diferentes grupos de 10 plantas cada uno: a) un grupo control no inoculado, b) un grupo control inoculado con *B. cinerea*, c) *n* grupos control con tratamiento y no inoculados, d) *n* grupos con tratamiento e inoculados con *B. cinerea*, donde *n* es el número de

compuestos a ensayar en planta. Estos se seleccionarán en función de los resultados obtenidos en el ensayo de efecto fungicida en placa.

Todos los ensayos se realizarán por triplicado de forma independiente.

4.4.1. Tratamiento

En los grupos con tratamiento, se pulverizarán 10 mL de disolución del compuesto correspondiente sobre el haz y envés de una hoja de cada planta (hoja local). La hoja opuesta, no tratada, se tomará como sistémica. La concentración de los compuestos en disolución se determinará atendiendo a los valores de ED₅₀ obtenidos en los ensayos en placa. Para el grupo control se emplearán 10 mL de una mezcla de etanol:agua (1:1000 [v/v]), dado que esta será la concentración de etanol en cada uno de los tratamientos.

Las plantas se incubarán en una cámara con un fotoperiodo de 16 h de luz con una temperatura de 25°C y 8 h de oscuridad a 18°C.

4.4.2. Inoculación

Transcurridas 24 h desde el tratamiento, se llevará a cabo la inoculación del patógeno mediante la aplicación de discos de micelio de 5 mm de diámetro obtenidos a partir de un cultivo de *B. cinerea* con 4 días de crecimiento (García *et al.*, 2018). Se colocarán dos discos en la superficie de la hoja, separados entre sí, evitando los nervios centrales y con el micelio en contacto directo con el haz de la hoja. En el grupo control no inoculado se utilizarán discos de medio PDA. Una vez inoculadas, las plantas se mantendrán en la cámara de cultivo en condiciones de humedad relativa elevada para favorecer la infección.

4.4.3. Determinación de síntomas

La evolución de los síntomas se seguirá durante tres días tras la inoculación. Los síntomas se determinarán usando dos parámetros: incidencia (porcentaje de lesiones expandidas) y severidad (área de las lesiones) a las 48 y 72 h de la inoculación. Se tomarán dos medidas perpendiculares del diámetro de las lesiones con un calibre digital. Se considerarán lesiones expandidas aquellas que presenten un diámetro superior a 5 mm (García *et al.*, 2018).

Se compararán los resultados obtenidos entre los diferentes grupos, así como entre hojas locales (tratadas) y sistémicas (no tratadas) con el fin de evaluar si existen diferencias en la eficacia a nivel local y sistémico.

4.4.4. Estudio de fitotoxicidad

Junto con el ensayo de eficacia en planta, se realizará simultáneamente un estudio de los posibles efectos fitotóxicos de los compuestos empleados. Con este objetivo, tras la aplicación de los tratamientos en los grupos no inoculados con *B. cinerea*, se vigilará la aparición de síntomas como necrosis o clorosis durante una semana.

4.4.5. Optimización del tratamiento más efectivo

Atendiendo a los resultados obtenidos, se seleccionará el compuesto que presente una mayor eficacia en planta y se optimizará su concentración. Para ello, se ensayarán concentraciones superiores e inferiores a la empleada en los experimentos iniciales, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

4.5. Ensayo de expresión génica

El estudio de la inducción de resistencia se realizará mediante la medida de los niveles de expresión de dos genes relacionados con la defensa de la planta de tomate: *PAL* (fenilalanina amonio liasa) y *PR1a* (proteína relacionada con la patogénesis PR1a). La enzima PAL está implicada en el reforzamiento de la pared celular frente a patógenos por acumulación de compuestos fenólicos y lignina (Vanitha *et al.*, 2009), mientras que las proteínas PR1 presentan actividad fungicida (Niderman *et al.*, 1995).

Se ensayará únicamente el compuesto que haya presentado mejores resultados de eficacia en planta. Para ello, se emplearán los mismos grupos de plantas que en el ensayo anterior, pero en este caso cada uno de ellos estará constituido por 6 plantas. El tratamiento se aplicará siguiendo el mismo procedimiento.

Todos los ensayos se realizarán por triplicado de forma independiente.

4.5.1. Recogida y preparación de muestras

Transcurridas 24 h tras la aplicación del tratamiento, se cortarán las dos primeras hojas verdaderas de las 6 plantas de cada grupo. Las muestras serán pesadas, congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C.

4.5.2. Extracción de RNA y obtención de cDNA

La extracción de RNA total se llevará a cabo empleando el Kit para RNA de plantas E.Z.N.A.® (Omega Bio-Tek), siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se obtendrá mediante el kit de síntesis de cDNA qScript™ (Quantabio), siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.5.3. Análisis por q-PCR

Con el cDNA obtenido se analizará la expresión génica de *PAL* y *PR1a* mediante una PCR cuantitativa (qPCR), utilizando un Bio-Rad iCycler iQ™ System. Esta será realizada en los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña (UDC).

Los cebadores a emplear se recogen en la *Tabla 1*. El gen *SIEF*, que codifica para el factor de elongación 1 α , se usará como gen de referencia (Martínez-Medina *et al.*, 2013; López-Ráez *et al.*, 2010). Cada reacción se realizará por duplicado. La expresión relativa de los genes se calculará siguiendo el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Tabla 1. Cebadores a emplear en la qPCR. Fuente: adaptado de Martínez-Medina et al. (2013).

Genes	Cebadores (5'-3')
<i>PAL</i>	CGTTATGCTCTCCGAACATC GAAGTTGCCACCATGTAAGG
<i>PR1a</i>	GTGGGATCGGATTGATATCCT CCTAAGCCACGATACCATGAA
<i>SIEF</i>	GATTGGTGGTATTGGAAGTGC AGCTTCGTGGTGCATCTC

5. VIABILIDAD DEL PROYECTO: PLAN DE TRABAJO

El proyecto se ajusta a la elaboración de un Trabajo de Fin de Máster y se desarrollará a lo largo de nueve meses. A continuación, se recoge el cronograma detallado con las tareas a realizar (*Tabla 2*).

Tabla 2. Cronograma detallado del proyecto.

TAREAS	SUBTAREAS	MESES											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Ensayo de actividad fungicida en placa	Ensayos iniciales y selección de compuestos y concentraciones												
	Ensayo definitivo y cálculo de ED ₅₀												
Ensayo de eficacia en planta	Cultivo de plantas y hongo												
	Tratamientos e inoculación												
	Evaluación de síntomas causados por <i>B. cinerea</i>												
	Evaluación de potencial fitotoxicidad de los compuestos												
	Optimización del tratamiento más efectivo												
Ensayo de expresión génica	Cultivo de plantas												
	Toma de muestras												
Difusión de resultados	Extracción de RNA, RT-PCR y análisis por qPCR												
	Elaboración y defensa de TFM												
	Asistencia a congresos, charlas y jornadas												

6. ESTIMACIÓN PRESUPUESTARIA

El proyecto se desarrollará en el laboratorio del grupo de investigación de Fisiología e Aplicaciones das Plantas (FISAPLANT) de la Universidade da Coruña (UDC). En la *Tabla 3* se recogen los recursos necesarios para la realización del proyecto, junto con una estimación de su coste.

Tabla 3. Estimación presupuestaria. Nota: La mayor parte de los precios se corresponden con las tarifas del proveedor VWR.

Recursos	Coste aproximado (€)
Material biológico, inventariable y fungible ya disponible en el grupo FISAPLANT	
Agitador magnético con placa calefactora	
Autoclave	
Aislado B05.10 de <i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr.	
Balanza analítica	
Calibre digital	
Cámaras de cultivo de plantas y de hongos	
Cámara de flujo laminar	
Centrifugas	
Congelador	
Máscara facial completa	
Material de vidrio	
Micropipetas	
Nevera	
Pulverizadores	
Sacabocados 5 mm	
Semilleros	
Termociclador	
Material fungible	
Semillas de tomate cv Moneymaker	6,5
Compuestos A, D, A1, A2, D1 y D2	Grupo QUIMOLMAT
Etanol	30,9
Sustrato vermiculita	10,9
Sustrato tierra	10,45
Placas Petri	58,1
Patata Dextrosa Agar	275
Puntas de micropipeta	42
Tubos 1,5 mL (tipo Eppendorf)	14,04
Tubos PCR	30
Kit para RNA de plantas E.Z.N.A.® ((Omega Bio-Tek)	184,41
Kit de síntesis de cDNA qScript™ (Quantabio)	290,4
Cebadores (R. Costoya)	60

Guantes desechables	16,2
Parafilm	12,1
Alcohol sanitario	23,12
Lejía	10
Servicios contratados (SAI)	
q-PCR	678,24
Otros recursos	
Inscripción y asistencia a congresos	1000
TOTAL	2752,36

7. IMPLICACIONES ÉTICAS Y/O DE BIOSEGURIDAD

El presente proyecto de investigación no vulnera ninguno de los principios éticos y legales de la ciencia. Se trabajará con material vegetal y fúngico, por lo que no existen aspectos éticos a valorar.

Los residuos de las plantas inoculadas y del propio patógeno serán esterilizados en autoclave antes de su eliminación.

CONCLUSIONES O HITOS QUE SE PRETENDEN ALCANZAR

Con el presente proyecto se pretende caracterizar el potencial fitosanitario de ligandos hidrazona y tiosemicarbazona y sus complejos de zinc(II) derivados contra el hongo patógeno *Botrytis cinerea* en planta de tomate.

El ensayo de actividad fungicida en cultivo puro de *B. cinerea* permitirá seleccionar los compuestos que presenten una mayor capacidad inhibitoria para su posterior aplicación en planta de tomate. Este segundo ensayo en planta permitirá la evaluación de la eficacia de los compuestos seleccionados, así como el estudio del efecto local y sistémico que puedan producir en la planta. En caso de que se obtengan resultados positivos, se llevará a cabo la optimización del tratamiento más efectivo. Como fase final, se empleará dicho compuesto en el estudio de la expresión de dos genes relacionados con la defensa de la planta. Un incremento en sus niveles de expresión génica indicaría que el compuesto funciona como inductor de resistencia en la planta de tomate.

CONCLUSIÓNS OU FITOS QUE SE PRETENDEN ACADAR

Co presente proxecto preténdese caracterizar o potencial fitosanitario de ligandos hidrazona e tiosemicarbazona e os seus complexos de zinc(II) derivados contra o fungo patóxico *Botrytis cinerea* en planta de tomate.

O ensaio de actividade funxicida en cultivo puro de *B. cinerea* permitirá seleccionar os compostos que presenten unha maior capacidade inhibitoria para a súa posterior aplicación en planta de tomate. Este segundo ensaio en planta permitirá a avaliación da eficacia dos compostos seleccionados, así como o estudo do efecto local e sistémico que poidan producir na planta. No caso de que se obteñan resultados positivos, levarase a cabo a optimización do tratamento máis efectivo. Como fase final, empregarase dito composto no estudo da expresión de dous xenes relacionados ca defensa da planta. Un incremento nos seus niveis de expresión xénica indicaría que o composto funciona como inductor de resistencia na planta de tomate.

CONCLUSIONS OR MILESTONES TO BE ACHIEVED

The aim of the present project is to characterize the phytosanitary potential of hydrazone and thiosemicarbazone ligands and their zinc(II) complexes against the pathogenic fungus *Botrytis cinerea* in tomato plants.

The fungicidal activity assay in pure culture of *B. cinerea* will allow the selection of compounds with higher inhibitory capacity for their subsequent application in tomato plants. This second plant test will allow the evaluation of the efficacy of the selected compounds, as well as the study of the local and systemic effect that they may produce in the plant. If positive results are achieved, optimization of the most effective treatment will be carried out. As a final phase, that selected compound will be used in the study of the expression of two tomato genes related to plant defence. Increase in their gene expression levels would indicate that the compound might work as a resistance inducer in tomato plant.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (5.^a ed.). Elsevier.
- Bellée, A., Cluzet, S., Dufour, M. C., Mérillon, 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, 3338–3350.
- Beraldo, H. & Gambino, D. (2005). The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4, 31–39.
- Degola, F., Morcia, C., Bisceglie, F., Mussi, F., Tumino, G., Ghizzoni, R., Pelosi, G., Terzi, V., Buschini, A., Restivo, F. M. & Lodi, T. (2015). *In vitro* evaluation of the activity of thiosemicarbazone derivatives against mycotoxigenic fungi affecting cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 104–111.
- Delaunois, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S. & Cordelier, S. (2014). Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 4837–4846.
- Díaz, J., ten Have, A. & Van Kan, J. A. L. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 129, 1341–1351.
- FAO. (2020). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Consultado el 19 de agosto de 2020. <http://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/tomato/en/>.
- FAOSTAT. (2018). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Consultado el 19 de agosto de 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.

- Fernández-Ortuño, D., Chen, F. & Schnabel, G. (2013). Resistance to cyprodinil and lack of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry in North and South Carolina. *Plant Disease*, 97, 81–85.
- Fillinger, S. & Elad, Y. (eds.). (2016). *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer International Publishing.
- García, T., Veloso, J. & Díaz, J. (2018). Properties of vanillyl nonanoate for protection of pepper plants against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 150, 1091–1101.
- Guan, A. Y., Liu, C. L., Sun, X. F., Xie, Y. & Wang, M. A. (2016). Discovery of pyridine-based agrochemicals by using intermediate derivatization methods. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24, 342–353.
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, 347.
- Kasuga, N. C., Sekino, K., Ishikawa, M., Honda, A., Yokoyama, M., Nakano, S., Shimada, N., Koumo, C. & Nomiya, K. (2003). Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 96, 298–310.
- Kovala-Demertzi, D., Yadav, P. N., Wiecek, J., Skoulika, S., Varadinova, T. & Demertzis, M. A. (2006). Zinc(II) complexes derived from pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazone and (1E)-1-pyridin-2-ylethan-1-one thiosemicarbazone. Synthesis, crystal structures and antiproliferative activity of zinc(II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 1558–1567.
- Liu, S., Che, Z. & Chen, G. (2016). Multiple-fungicide resistance to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea* from tomato in Henan Province, China. *Crop Protection*, 84, 56–61.
- López-Ráez, J. A., Verhage, A., Fernández, I., García, J. M., Azcón-Aguilar, C., Flors, V. & Pozo, M. J. (2010). Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and

- the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany*, 61, 2589–2601.
- Martínez-Medina, A., Fernández, I., Sánchez-Guzmán, M. J., Jung, S. C., Pascual, J. A. & Pozo, M. J. (2013). Deciphering the hormonal signaling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 4, 206.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. & Mössinger, E. (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. *Plant Physiology*, 108, 17–27.
- Núñez Fernández, R. (2019). *Evaluación de derivados de la piridina como potenciales fitosanitarios frente a Botrytis cinerea y Phytophthora capsici* [Trabajo Fin de Máster, Universidade da Coruña].
- Petrasch, S., Knapp, S. J., van Kan, J. A. L. & 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.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9.
- Rodríguez Montes, A. (2020). *Síntesis de complejos con potencial actividad fitosanitaria* [Trabajo Fin de Grado, Universidade da Coruña].
- Rogolino, D., Gatti, A., Carcelli, M., Pelosi, G., Bisceglie, F., Restivo, F. M., Degola, F., Buschini, A., Montalbano, S., Feretti, D. & Zani, C. (2017). Thiosemicarbazone scaffold for the design of antifungal and antiaflatoxic agents: evaluation of ligands and related copper complexes. *Scientific Reports*, 7, 11214.
- Rupp, S., Weber, R. W. S., Rieger, D., Detzel, P. & Hahn, M. (2017). Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in german horticulture. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2075.

- Vanitha, S. C., Niranjana, S. R. & Umesha, S. (2009). Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, 157, 552–557.
- Veloso, J. & van Kan, J. A. L. (2018). Many shades of grey in *Botrytis*–host plant interactions. *Trends in Plant Science*, 23, 613–622.
- Verma, G., Marella, A., Shaquiquzzaman, M., Akhtar, M., Ali, M. R. & Alam, M. M. (2014). A review exploring biological activities of hydrazones. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 6, 69–80.
- Villa, F., Cappitelli, F., Cortesi, P. & Kunova, A. (2017). Fungal biofilms: targets for the development of novel strategies in plant disease management. *Frontiers in Microbiology*, 8, 654.
- Villar Martínez, B. (2018). *Evaluación de las propiedades fungicidas de un compuesto derivado de la piridina frente a hongos patógenos* [Trabajo Fin de Grado, Universidade da Coruña].
- Walters, D. R. & Fountaine, J. M. (2009). Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *Journal of Agricultural Science*, 147, 523–535.
- Walters, D. R., Ratsep, J. & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64, 1263–1280.
- Wan, F. X., Wang, J. H., Shi, Y. H., Niu, L. Z. & Jiang, L. (2018). Design, synthesis and antifungal activity of novel benzoylcarbamates bearing a pyridine moiety. *Applied Sciences*, 8, 2577.
- Wei, L., Tan, W., Zhang, J., Mi, Y., Dong, F., Li, Q. & Guo, Z. (2019). Synthesis, characterization, and antifungal activity of Schiff bases of inulin bearing pyridine ring. *Polymers*, 11, 371.
- 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.

Zani, C., Bisceglie, F., Restivo, F. M., Feretti, D., Pioli, M., Degola, F., Montalbano, S., Galati, S., Pelosi, G., Viola, G. V. C., Carcelli, M., Rogolino, D., Ceretti, E. & Buschini, A. (2017). A battery of assays as an integrated approach to evaluate fungal and mycotoxin inhibition properties and cytotoxic/genotoxic side-effects for the prioritization in the screening of thiosemicarbazone derivatives. *Food and Chemical Toxicology*, 105, 498–505.