

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Ensayo en plantas y organismos fitopatógenos de complejos con potencial actividad fitosanitaria

Ensaio en plantas e organismos fitopatóxenos de complexos con potencial actividade fitosanitaria

Assay in plants and phytopathogenic organisms of complexes with potential phytosanitary activity

Álvaro Rodríguez Tacón

Septiembre, 2021

Director 1: Dr. José Díaz Varela

Director 2: Dr. Javier Veloso Freire



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

D. JOSÉ DÍAZ VARELA, CATEDRÁTICO DE FISIOLoxÍA VEGETAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, Y D. JAVIER VELOSO FREIRE, CONTRATADO POSTDOCTORAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que el presente Trabajo de Fin de Grado presentado por el alumno ÁLVARO RODRÍGUEZ TACÓN y titulado:

“Ensayo en plantas y organismos fitopatóxenos de complejos con potencial actividade fitosanitaria”

“Ensaio en plantas e organismos fitopatóxenos de complexos con potencial actividade fitosanitaria”

“Assay in plants and phytopathogenic organisms of complexes with potential phytosanitary activity”

ha sido realizado bajo su dirección y autorizan su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en A Coruña, a 10 de Setiembre de 2021.

Fdo. José Díaz Varela

Fdo. Javier Veloso Freire

Índice

Resumen	1
1. Introducción	4
1.1. Planta huésped: <i>Capsicum annuum</i> L.	4
1.2. Patógenos.....	5
1.2.1. <i>Botrytis cinerea</i> Pers.	6
1.2.2. <i>Phytophthora capsici</i> Leonian	7
1.3. Desarrollo de nuevos fungicidas	7
1.3.1. Compuestos basados en piridina	7
1.3.2. Bases de Schiff.....	8
1.3.3. Mecanismo de acción.....	9
1.3.4. Compuestos a ensayar.....	10
2. Objetivos.....	12
3. Material y métodos	13
3.1. Preparación de disoluciones	13
3.2. Material biológico	13
3.3. Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>B. cinerea</i> y <i>P. capsici</i>	14
3.3.1. Preparación de los medios	14
3.3.2. Siembra de los patógenos.....	15
3.3.3. Toma de datos.....	15
3.4. Experimentos en planta	16
3.4.1. Preparación del inóculo	16
3.4.2. Aplicación del tratamiento e inoculación del patógeno	16
3.4.3. Toma de datos.....	17
4. Resultados y discusión	19
4.1. Experimentos en placa.....	19
4.2. Experimentos en plantas de pimiento	21
5. Conclusiones	26
Bibliografía.....	28

Resumen

Debido a las pérdidas económicas que suponen los patógenos y las plagas de cultivos como el pimiento, así como a la resistencia adquirida por estos a los pesticidas clásicos, es de vital importancia el estudio y continuo desarrollo de agentes alternativos.

El presente trabajo aborda un estudio de las propiedades como potenciales agentes fitosanitarios de diferentes ligandos semicarbazona y tiosemicarbazona, así como de sus complejos derivados de zinc(II). En él se pretende conocer la respuesta de dos patógenos de la citada planta, el oomiceto *Phytophthora capsici* y el hongo ascomicete *Botrytis cinerea*, a distintos tratamientos empleando estos compuestos.

Esto se ha llevado a cabo realizando ensayos de inhibición del crecimiento *in vitro* y ensayos de eficacia en planta de pimiento (*Capsicum annuum*), habiéndose observado diferencias en la inhibición del crecimiento según el patógeno, así como indicios de inducción de resistencia en la planta.

Palabras clave

Antifúngico; *Botrytis cinerea*; Fitosanitario; Oomiceto; Patógeno; *Phytophthora capsici*; Resistencia; Semicarbazona; Tiosemicarbazona.

Resumo

Debido ás perdas económicas que supoñen os patóxenos e as pragas de cultivos como o pemento, así como á resistencia adquirida por estes aos pesticidas clásicos, é de vital importancia o estudo e continuo desenvolvemento de axentes alternativos.

O presente traballo aborda un estudo das propiedades como potenciais axentes fitosanitarios de diferentes ligandos semicarbazona e tiosemicarbazona, así como dos seus complexos derivados de zinc(II). Nel téntase coñecer a resposta de dous patóxenos da devandita planta, o oomiceto *Phytophthora capsici* e o fungo ascomicete *Botrytis cinerea*, a distintos tratamentos empregando estes compostos.

Isto fíxose realizando ensaios de inhibición do crecemento *in vitro* e ensaios de eficacia en planta de pemento (*Capsicum annuum*), observándose diferenzas na inhibición do crecemento segundo o patóxeno, así como indicios de indución de resistencia na planta.

Palabras chave

Antifúnxico; *Botrytis cinerea*; Fitosanitario; Oomiceto; Patóxeno; *Phytophthora capsici*; Resistencia; Semicarbazona; Tiosemicarbazona.

Abstract

Due to the economic losses caused by pathogens and pests of crops such as pepper, as well as the resistance acquired by these to the classic pesticides, the study and continuous development of new agents is essential.

The present work addresses a study of the properties of different semicarbazone and thiosemicarbazone ligands, as well as their derived zinc(II) complexes, as potential phytosanitary agents. The aim was to know the response of two of the most frequent pathogens in this plant, the oomycete *Phytophthora capsici* and the ascomycete fungus *Botrytis cinerea*, to different treatments using these compounds.

This has been accomplished by carrying out *in vitro* growth inhibition tests and efficacy tests on pepper plants (*Capsicum annuum*), and the results showed differences in growth inhibition depending on the pathogen, as well as evidence of induced resistance in the plant.

Keywords

Antifungal; *Botrytis cinerea*; Oomycete; Pathogen; *Phytophthora capsici*; Phytosanitary; Resistance; Semicarbazone; Thiosemicarbazone.

1. Introducción

Conseguir la disponibilidad global de alimentos ha supuesto un elevado número de desafíos durante los inicios del siglo XXI, como las pérdidas de producción anuales de entre el 20 y el 40% debido a enfermedades y plagas que afectan a los cultivos.

Si bien los fungicidas son un método ampliamente extendido como tratamiento de muchas enfermedades en agricultura, deben ser empleados siguiendo una estricta regulación que cumpla con los requisitos sanitarios y medioambientales. Este hecho, sumado a la constante aparición de resistencias a pesticidas, ha estimulado la búsqueda de alternativas que combinen distintas estrategias para tratar enfermedades y plagas de manera más eficiente, sostenible y respetuosa con el medioambiente [1].

1.1. Planta huésped: *Capsicum annuum* L.

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es una especie de plantas perteneciente a la familia Solanaceae, caracterizada por su porte herbáceo o arbustivo, por ser anuales (convertidas en perennes cuando son cultivadas en condiciones favorables) [2] y por poseer un fruto de importante valor alimenticio en la actualidad.

En 2019 se produjeron mundialmente 38.027 millones de kilos de pimiento, liderando la producción China con 18.978 millones (50% del total), y con España como quinto productor mundial, contribuyendo con 1.402 millones, suponiendo un 4% del total (Figura 1). El área destinada en todo el mundo al cultivo de pimiento fue, en ese año, de 2 millones de hectáreas [3]. La distribución geográfica de la producción mundial de pimiento puede observarse en la Figura 2.

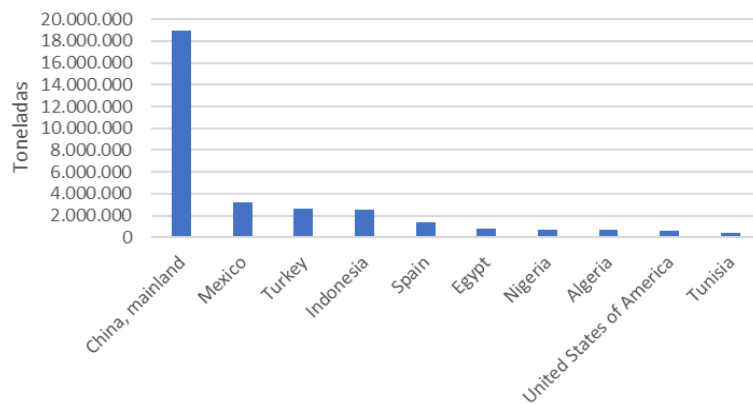


Figura 1: Principales productores de la producción de pimienta a nivel global en 2019, en toneladas. Tomado de FAOSTAT, 2019 [3]

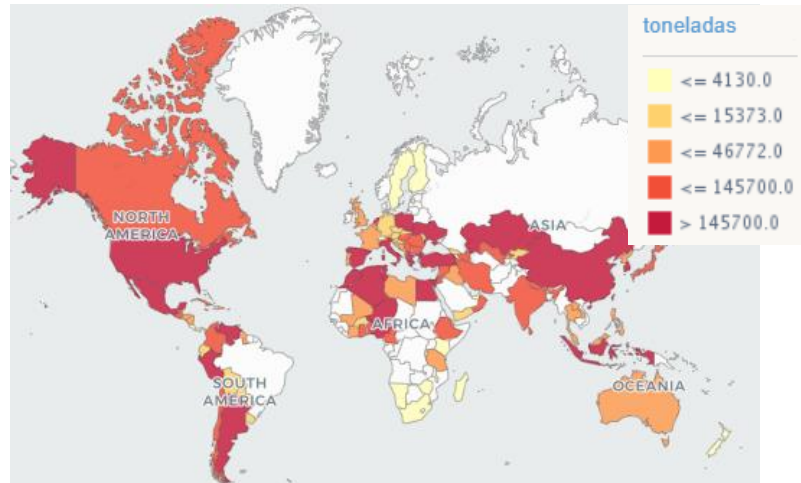


Figura 2: Distribución geográfica de la producción mundial de pimienta en 2019, en toneladas. Tomado de FAOSTAT, 2019 [3]

1.2. Patógenos

Debido a los problemas que suponen plagas y patógenos para estos cultivos, es de vital importancia combatir aquellos que más les perjudican, así como desarrollar continuamente nuevos tratamientos. Dos de los patógenos más frecuentes en el pimienta son el hongo *Botrytis cinerea* y el oomiceto *Phytophthora capsici*.

1.2.1. *Botrytis cinerea* Pers.

Las enfermedades causadas por especies del género *Botrytis* son probablemente las más comunes y extendidas entre las plantas [4]. *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. [teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel], comúnmente conocido como “moho gris”, es un hongo fitopatógeno que afecta a más de 1000 especies vegetales, incluyendo importantes cultivos como la vid, el tomate, o la fresa (Figura 3) y entre los que también se incluye el pimiento [5]. Los síntomas más habituales comprenden la podredumbre de todas las partes aéreas de la planta, incluyendo frutos y flores, con la posterior aparición de masas de conidios [4].



Figura 3: Hongo patógeno *Botrytis cinerea* en melocotón (izda, tomada Nelson, 2020) [6] y vid (dcha, tomada de Vinoble Jerez, 2020) [7]

Dado que el crecimiento de este hongo está favorecido por condiciones de elevada humedad y temperatura, es considerablemente mayor el riesgo de infección en cultivos de invernadero [4]. La gran plasticidad genética y la elevada capacidad de formación de conidios para reproducirse asexualmente han provocado que *B. cinerea* haya desarrollado resistencia a numerosos fungicidas, terminando incluso en la aparición de cepas multirresistentes [8]. El control químico recomendado para el tratamiento de las enfermedades provocadas por *Botrytis* debe incluir diferentes fungicidas en distintas combinaciones, reduciendo así la aparición y extensión de cepas resistentes [9].

1.2.2. *Phytophthora capsici* Leonian

Las especies del género de oomicetos *Phytophthora* causan una gran variedad de enfermedades a cultivos, plantas ornamentales y explotaciones forestales. Uno de los efectos más devastadores que provoca este patógeno es la reducción de poblaciones de especies autóctonas, apareciendo en épocas recientes nuevas cepas más resistentes e infecciosas. Algunas de las especies más conocidas son *P. infestans*, causante de los históricos estragos en cultivos de patata en Europa en el siglo XIX, y *P. capsici*, que infecta a solanáceas, fabáceas y cucurbitáceas principalmente. La enfermedad causada por esta especie en pimiento es comúnmente conocida como “tristeza”, y sus síntomas más característicos son la podredumbre del cuello del tallo y la marchitez foliar (Figura 4) [9].



Figura 4: Marchitez foliar (izda) y podredumbre del cuello (dcha) en plantas de pimiento, causadas por el oomiceto patógeno *Phytophthora capsici*. (tomadas de McGrath, 2021) [10]

1.3. Desarrollo de nuevos fungicidas

Los fungicidas son sustancias capaces de eliminar o inhibir el crecimiento de hongos, y son habitualmente empleados para controlar a aquellos que son patógenos. La estructura de estos compuestos puede ser muy variada, siendo algunas de las vías actuales de investigación el desarrollo de productos fitosanitarios basados en heterociclos aromáticos o en compuestos tipo “base de Schiff” [11].

1.3.1. Compuestos basados en piridina

Uno de los heterociclos aromáticos presente en la estructura molecular de numerosos productos fitosanitarios es el anillo de piridina (Figura 5). Sus derivados son

frecuentemente empleados en agroquímica por exhibir propiedades como fungicida, insecticida o herbicida [12] [13] [14]. Derivan de esta estructura productos fitosanitarios clásicos, tales como el fungicida Fluazinam, el herbicida Paraquat o el insecticida Clorpirifós, cuyas estructuras pueden verse en la Figura 6.

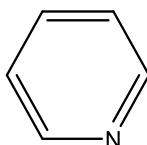


Figura 5: Estructura de la piridina

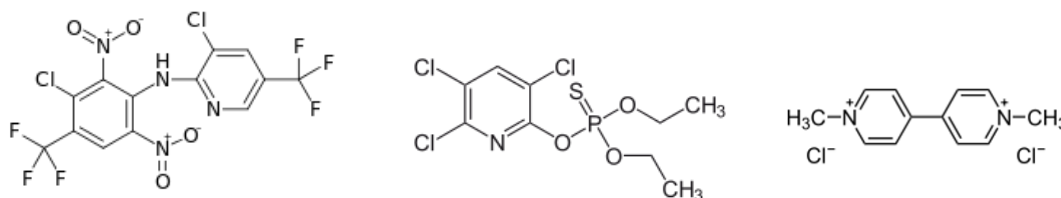


Figura 6: Estructura molecular del Fluazinam (izda), Paraquat (centro) y Clorpirifós (dcha)

1.3.2. Bases de Schiff

Las bases de Schiff (Figura 7) son un tipo de compuestos que contiene un grupo imino ($C=N$) y se forman mediante la reacción de un grupo amino primario con un grupo carbonilo activo [15]. Estos compuestos han sido ampliamente empleados en catálisis, farmacología y síntesis de fungicidas. Se ha comprobado que la actividad antifúngica de los compuestos tipo “base de Schiff” es mayor que la de compuestos con estructuras análogas que no lo son [11].

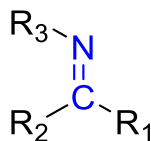


Figura 7: Estructura general de una base de Schiff (en azul, el grupo funcional imino)

Unas de las bases de Schiff más empleadas en el estudio y desarrollo de nuevos compuestos con potencial actividad fungicida son las semicarbazonas y las tiosemicarbazonas (Figura 8).

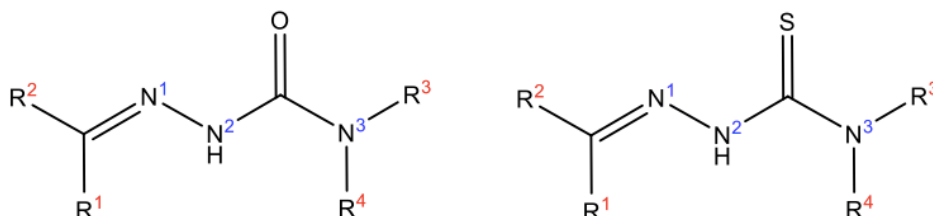


Figura 8: Estructura general de una semicarbazona (izda) y una tiosemicarbazona (dcha)

Semicarbazonas, tiosemicarbazonas y sus derivados complejos metálicos han sido ampliamente estudiados recientemente [16] [17], principalmente debido a sus propiedades biológicas y antimicrobianas [18] [19] [20]. Estos compuestos actúan como ligandos quelato de metales de transición, empleando para ello el átomo de oxígeno/azufre de su grupo carbonilo/tionilo y el nitrógeno de su grupo imino, pudiendo aumentar o disminuir su actividad entre la forma libre y la coordinada al metal [21].

Sin embargo, las semicarbazonas han recibido una menor atención por parte de los investigadores que sus análogos azufrados, siendo interesante comprobar las propiedades de los múltiples derivados de este tipo de compuestos [22] [23].

Los derivados de tiosemicarbazonas, por otro lado, sí han sido el centro de atención de la investigación química-biológica debido a su conocida actividad [24]. Sus propiedades no se limitan a la actividad antibacteriana y antifúngica [25] [26], sino que se han encontrado derivados con actividad antiviral [27], antimalaria [28] o antitumoral [29], entre otras.

1.3.3. Mecanismo de acción

Es conocido que las tiosemicarbazonas son excelentes quelantes de metales de transición, estando relacionada frecuentemente su actividad biológica con su capacidad de formar complejos metálicos [30]. Recientemente, se ha descubierto la

capacidad de las tiosemicarbazonas de unirse al hierro e intervenir en un ciclo redox, causando la generación de radicales libres citotóxicos que podrían tener un importante papel en su actividad como inhibidores de la proliferación celular [31]. Dado que el hierro es fundamental en numerosos procesos celulares, tales como la síntesis de ADN, cabe esperar efectos severos de aquellos compuestos capaces de alterar los niveles o estado de oxidación de este metal [32].

1.3.4. Compuestos a ensayar

Los compuestos basados en heterociclos aromáticos son excelentes candidatos como agentes fitosanitarios debido a su potencial actividad antifúngica. Este hecho, sumado al hecho de que los compuestos tipo “base de *Schiff*” son foco de atención en este campo debido a que optimizan dichas propiedades, postula a las semicarbazonas y tiosemicarbazonas derivadas de la piridina como potenciales agentes fitosanitarios.

En este contexto global, el presente Trabajo de Fin de Grado aborda el estudio de la potencial actividad fitosanitaria de dos ligandos semicarbazona (**L1** y **L2**) y dos ligandos tiosemicarbazona (**L3** y **L4**), así como de los respectivos complejos metálicos derivados de zinc(II) de aquellos que presentaron mejores resultados. Estos compuestos fueron sintetizados en el TFG del Grado en Química “*Síntesis de complejos con potencial actividad fitosanitaria*” coordinado con el presente trabajo desarrollado en el grupo de investigación QUIMOLMAT perteneciente a la Universidade da Coruña (UDC).

A continuación, se muestran las estructuras de los ligandos (Figura 8) y sus respectivos complejos metálicos (Figura 9) objeto de estudio del presente trabajo.

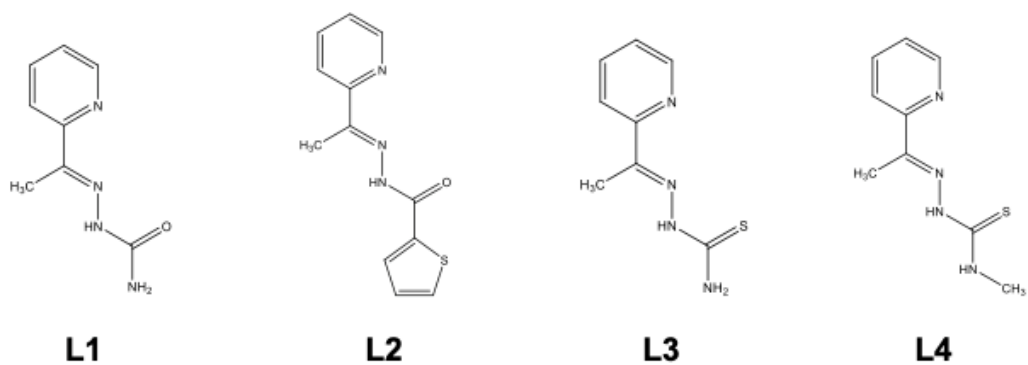


Figura 9: Estructura de los ligandos **L1**, **L2**, **L3** y **L4**

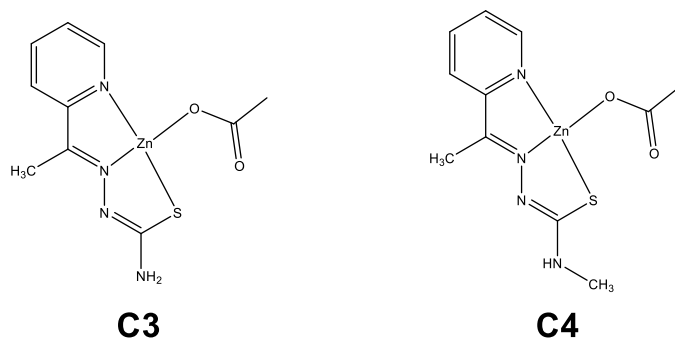


Figura 10: Estructura de los complejos metálicos de zinc(II) **C3** y **C4**, derivados de los ligandos **L3** y **L4** respectivamente, cada uno con un coligando acetato

2. Objetivos

El principal objetivo del presente trabajo es estudiar la potencial actividad fitosanitaria de compuestos semicarbazona y tiosemicarbazona así como sus complejos derivados de zinc (previamente sintetizados previamente en el TFG del Grado en Química coordinado con el presente trabajo) frente a patógenos de pimiento (*C. annuum*).

Atendiendo a los objetivos específicos, se plantea:

1. Estudiar la capacidad de compuestos semicarbazona y tiosemicarbazona para inhibir el crecimiento del hongo patógeno *Botrytis cinerea* y el oomiceto patógeno *Phytophthora capsici*.
2. Comprobar si los compuestos con mejores resultados en el estudio del objetivo 1 son eficaces para proteger a la planta de pimiento frente a dichos patógenos.

3. Material y métodos

3.1. Preparación de disoluciones

Previamente se estudió la solubilidad de los diferentes compuestos objeto del presente trabajo con el fin de seleccionar el disolvente más adecuado para la realización de los ensayos de actividad fitosanitaria. Tras ello, se prepararon disoluciones stock de concentración 0,2 M de cada compuesto en el respectivo disolvente que se muestra en la Tabla 1, en la que también se indica la masa molecular de cada compuesto.

Tabla 1: Masas moleculares y disolvente más adecuado para los compuestos objeto de estudio

Compuesto	L1	L2	L3	L4	C3	C4
Masa molecular (g/mol)	178,19	245,30	194,26	208,28	283,03	298,04
Disolvente	EtOH/H ₂ O 50:50	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO

En función del ensayo fue requerida la preparación de diferentes diluciones a partir de las disoluciones stock mencionadas con el fin de estudiar el efecto de la concentración en su actividad. Para esto, se prepararon medios de cultivo con concentraciones en un rango 5-100 μ M.

Para la administración de los tratamientos en los ensayos en planta se prepararon dos disoluciones 25 μ M, bien de **L4** o bien de **C4**, ambos en DMSO al 0,1%. Para los controles se utilizó únicamente DMSO al 0,1%.

3.2. Material biológico

Los organismos patógenos fueron obtenidos a partir de la colección del grupo de investigación FISAPLANT de la Universidade da Coruña. Concretamente, se utilizaron los aislados B05.10 de *B. cinerea* y PC450 de *P. capsici*.

Para los ensayos en plantas de pimiento, se emplearon ejemplares jóvenes de *Capsicum annuum* var. "Padrón" adquiridas en *Productos Agrícolas A Agraria* (Cambre), y que el proveedor obtuvo a partir de semillas comercializadas por Ramiro Arnedo Semillas S.A. Estas se encontraban en bandejas de semillero con pocillos rellenos con sustrato vegetal.

3.3. Ensayo de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* y *P. capsici*

Estos experimentos consisten en el cultivo *in vitro* en placa de un patógeno en presencia de un potencial agente antimicrobiano, estudiando las posibles diferencias en el crecimiento frente a un control.

Para ello se prepararon placas Petri con medio sólido PDA (Patata Dextrosa Agar, marca VWR®) sobre las que se cultivaron los patógenos (*Botrytis cinerea* y *Phytophthora capsici*) para posteriormente estudiar el efecto de diferentes compuestos (**L1**, **L2**, **L3**, **L4**, **C3** y **C4**) sobre su crecimiento. Estos compuestos fueron añadidos a las placas en diferentes concentraciones previamente a la solidificación del medio.

3.3.1. Preparación de los medios

Durante todo el experimento se trabajó en condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar.

Se realizaron un total de seis experimentos en placa con los cuatro ligandos (**L1**, **L2**, **L3** y **L4**) y dos complejos de zinc(II) derivados de ellos (**C3** y **C4**).

Para cada ensayo se prepararon matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL cada uno de suspensión de PDA preparada siguiendo las instrucciones del fabricante (39 g de medio seco PDA por litro de agua destilada), con el fin de preparar 8 placas a partir cada uno. Los matraces se esterilizaron en autoclave (121 °C; 20 min; 1,1bar). Posteriormente se añadieron 0,1 mL de disolución del compuesto a ensayar para obtener una concentración final de 25 y 100 µM, y en algunos casos, concentraciones

inferiores. En el caso de los tratamientos control se añadió el disolvente indicado en la Tabla 1 hasta alcanzar una concentración igual a la de los otros tratamientos.

Tras la adición de los compuestos, se agitaron los matraces y se vertieron equitativamente en 8 placas Petri por cada matraz Erlenmeyer. Las placas se mantuvieron en la cámara de flujo durante unas horas hasta que se solidificaron por completo.

3.3.2. Siembra de los patógenos

Transcurrido el tiempo necesario, sobre las placas Petri con el agar solidificado y enfriado se repicaron fragmentos de cultivos previos del patógeno a estudiar (*Phytophthora capsici* o *Botrytis cinerea*) en fase de crecimiento (de aproximadamente una semana de antigüedad y sin signos aparentes de estructuras de reproducción asexual). Estos fragmentos se obtuvieron empleando un sacabocados de 9 mm de diámetro interno, depositando con una lanceta cada fragmento invertido sobre el centro de la nueva placa, permitiendo que el patógeno pueda crecer. Dado que cada matraz Erlenmeyer con 200 mL de disolución de agar permite llenar 8 placas Petri, se utilizó dicha cantidad para realizar 4 réplicas de cada tratamiento con cada uno de los dos patógenos ensayados. Una vez sembrado el patógeno las cuatro placas de *P. capsici* se sellaron con Parafilm®, mientras que a las cuatro placas de *B. cinerea* se les colocaron dos fragmentos de cinta adhesiva dejando disponibles los orificios entre la tapa y la placa, pues este hongo precisa de buena aireación para crecer.

3.3.3. Toma de datos

Para observar la inhibición del crecimiento de los patógenos por parte de los diferentes compuestos, se midió el diámetro del micelio empleando un calibre (con una precisión de 0,01 mm), anotándose los resultados cada 24 horas hasta que el micelio del control alcanzó el borde de la placa (72 horas). Las diferencias en el crecimiento a las 72 horas entre el control y los distintos tratamientos permitieron expresar como resultado el grado de inhibición que cada concentración de compuesto causa en los cultivos de patógeno.

3.4. Experimentos en planta

Los experimentos en planta se realizaron con el patógeno que más vio afectado su crecimiento (*Phytophthora capsici*) y los compuestos que causaron un mayor grado de inhibición de los utilizados en los ensayos en placa, siendo estos **L4** y **C4**.

3.4.1. Preparación del inóculo

Para la inoculación del patógeno en las plantas fue necesario obtener zoosporas de *P. capsici*, proceso que se indujo comenzando con el repicado de fragmentos de micelio de un cultivo previo a placas con medio V8 agar (agar con zumo de verduras V8®, Campbell's). Se realizaron dos experimentos independientes.

Tras cinco días de crecimiento del patógeno en ese medio, se prepararon matraces Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL de disolución de KNO_3 10^{-5} M estéril. A cada matraz se le añadió media placa de medio V8 agar con el cultivo de *P. capsici* previamente troceado en fragmentos de aproximadamente 1 cm^2 . Los matraces conteniendo fragmentos de medio V8 con micelio de *P. capsici* se mantuvieron en agitación durante 72 horas.

Tras este período los matraces se enfriaron en nevera a 4°C durante 45 minutos, y posteriormente fueron incubados a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las zoosporas liberadas en el medio líquido se obtuvieron filtrando el cultivo a través de una gasa estéril.

La concentración de zoosporas fue cuantificada empleando una cámara de Malassez, ajustando posteriormente el inóculo a una concentración de 10.000 zoosporas/mL con agua bidestilada estéril.

3.4.2. Aplicación del tratamiento e inoculación del patógeno

Previamente a la inoculación del patógeno, se tomaron grupos de 12 plantas de pimiento por tratamiento y experimento. Se realizaron dos experimentos independientes con tres tratamientos distintos (control, tratamiento con **L4** y tratamiento con **C4**) y dos modos de aplicación del tratamiento para cada uno (pulverización sobre las hojas o absorción a través de la raíz).

Cada ensayo independiente constó de 72 individuos, separados en grupos de 12 plantas (Figura 11), que fueron encharcados con agua el día anterior a la inoculación con el patógeno. Para estos ensayos se emplearon las disoluciones de **L4** y **C4** de 25 μ M preparadas anteriormente.

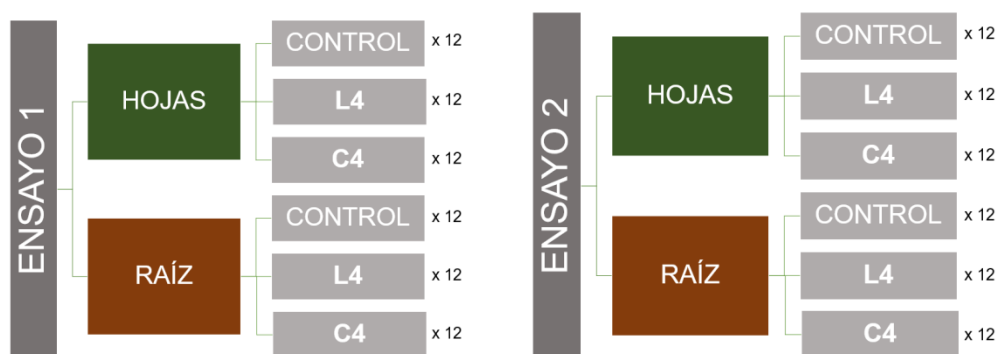


Figura 11: Esquema de los diferentes grupos y tratamientos que conformaron el ensayo en planta

De los 100 mL de disolución de cada compuesto, 18 mL se utilizaron para la aplicación mediante absorción a través de la raíz, vertiendo 1,5 mL de dicho contenido en la base del tallo de cada uno de los individuos de ese grupo, y los 82 mL restantes se pulverizaron sobre la superficie de las hojas del grupo correspondiente al ensayo de aplicación por dicho método. Al día siguiente a la aplicación del tratamiento, se realizó la inoculación del patógeno empleando una micropipeta para aplicar 5 mL de la suspensión de zoosporas de *P. capsici* sobre la base del tallo de cada uno de los individuos empleados en el experimento.

3.4.3. Toma de datos

Las plantas de ambos ensayos independientes se mantuvieron en invernadero durante la duración del experimento. Los síntomas estudiados fueron el número de abscisiones foliares de hojas verdaderas (excluyendo los cotiledones) y el grado de marchitez del hipocótilo, evaluando este último tanto cuantitativamente como cualitativamente.

La gravedad de los síntomas fue descrita siguiendo una escala que comprende las características mencionadas anteriormente con sus diferentes valores, tal que:

- Abscisión foliar: valor de 0 a 3.
 - 0: Ninguna hoja caída.
 - 1: Abscisión en 1 o 2 hojas.
 - 2: Abscisión en 3 o 4 hojas.
 - 3: Abscisión en 5 o más hojas.

- Marchitez del hipocótilo: valor de 0 a 3.
 - 0: No se aprecia marchitez.
 - 1: Lesión observable inferior a $1/3$ de la longitud del hipocótilo.
 - 2: Lesión observable de $1/3$ a $2/3$ de la longitud del hipocótilo.
 - 3: Lesión observable superior a $2/3$ de la longitud del hipocótilo.

Como medida complementaria de la gravedad de los síntomas, se determinó la longitud en mm de la necrosis del hipocótilo, para lo cual se utilizó un calibre (precisión 0,01 mm).

4. Resultados y discusión

4.1. Experimentos en placa

Los resultados obtenidos en los ensayos en placa se expresan como el porcentaje de inhibición del crecimiento de cada patógeno en presencia de cada tratamiento frente al control. Este parámetro fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Diámetro micelio en el tratamiento (mm)}}{\text{Diámetro micelio en el control (mm)}} \right) \cdot 100$$

A continuación, en la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos para los seis compuestos ensayados para cada uno de los dos patógenos a las dos concentraciones a las que se apreció efecto inhibitorio:

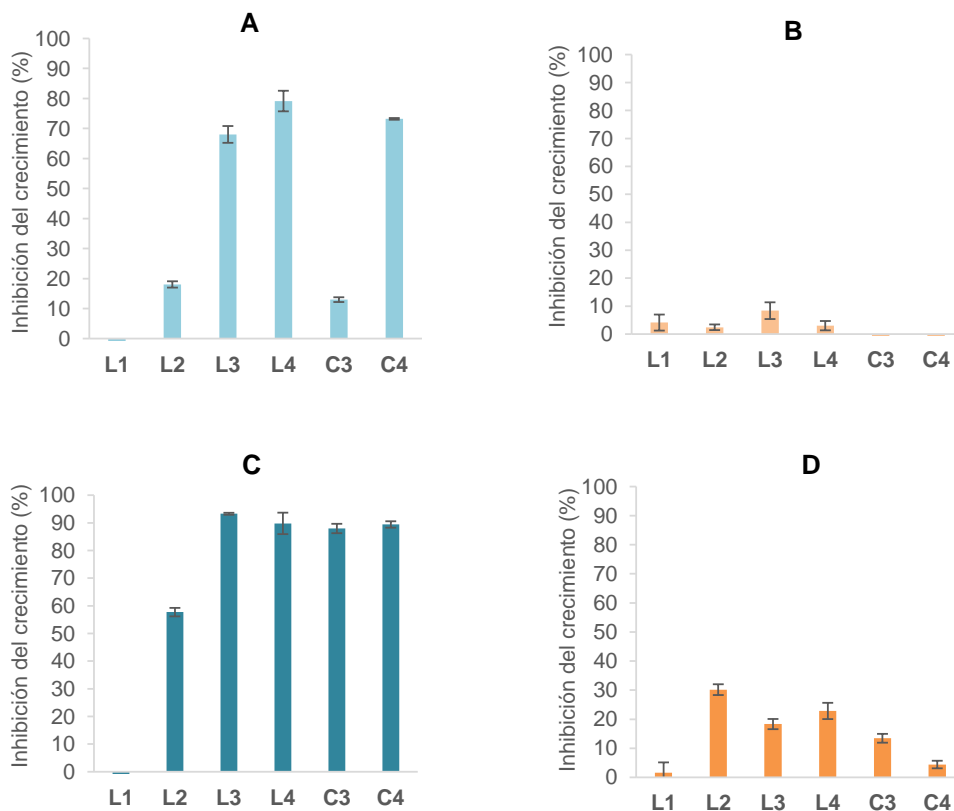


Figura 12: Resultados de los ensayos en placa expresados como la media del porcentaje de inhibición ± su error estándar (A: *P. capsici*, 25 µM; B: *B. cinerea*, 25 µM; C: *P. capsici*, 100 µM; D: *B. cinerea*, 100 µM)

El efecto inhibitorio sobre *Phytophthora* (Figura 12, gráfica A) es claramente superior al observado en el otro patógeno. Mientras que en el tratamiento con **L1** no se observó efecto alguno, y **L2** y **C3** no llegan a reducir el crecimiento del patógeno en un 20%, sí es destacable que **L3**, **L4** y **C4** consigan inhibir el crecimiento de *Phytophthora* en más de un 60%, destacando particularmente **L4** con un valor del 80%.

Sin embargo, como se puede observar en la gráfica B de la Figura 12, los ensayos realizados a concentración 25 μM muestran inhibición nula en el caso de *Botrytis*, siendo **L3** el único compuesto con un efecto observable a pesar de reducir en menos de un 10% el crecimiento del hongo. En el resto de los tratamientos la ausencia de inhibición o la variabilidad de los datos (referida como error estándar) no permiten asumir que existan diferencias en el crecimiento de *Botrytis* en presencia o ausencia de dichos compuestos.

Al observar el efecto de los tratamientos a una concentración cuatro veces mayor es notable cómo *Phytophthora* (Figura 12, gráfica C) es sensible a todos los compuestos excepto a **L1**. Si bien **L2** causa una inhibición cercana al 60%, **L3**, **L4**, **C3** y **C4** rondan una inhibición del 90% al ser aplicados en una concentración de 100 μM . En el caso de *Botrytis* (Figura 12, gráfica D), los tratamientos provocan entre un 10 y un 30% de inhibición del crecimiento, exceptuando la nula efectividad de **L1** y **C4**.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kasuga *et al.*, quienes utilizaron concentraciones similares de **L3** y observaron inhibición significativa del crecimiento de diversos microorganismos, tales como *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas aeruginosa*, pero reducida en los hongos *Aspergillus niger* y *Penicillium citrinus* [33].

Las diferencias entre el efecto sobre *Phytophthora* y sobre *Botrytis* indican que la diana celular de los compuestos que mostraron resultados positivos podría ser específica para cada patógeno. Dado que no se observó un efecto inhibitorio notable del crecimiento en el caso del hongo verdadero *Botrytis*, pero sí en *Phytophthora*, un oomiceto, sería interesante profundizar en el estudio con el fin de conocer el efecto de estos compuestos con otros hongos verdaderos beneficiosos naturalmente presentes en plantas, es decir, aquellos que forman micorrizas, para saber si se puede aplicar el tratamiento sin perjudicar a estas. Con todo esto, y dado que la diana celular es

probablemente distinta para cada patógeno, podrían combinarse distintos tratamientos con el fin de optimizar la eficacia del control fitosanitario.

4.2. Experimentos en plantas de pimiento

Los resultados obtenidos en los ensayos en placa han servido para decidir qué compuestos se utilizan en los ensayos en planta. Para estudiar el efecto que tiene la formación de un complejo metálico en la efectividad de estos compuestos, se seleccionaron **L4** y **C4** como los dos compuestos a emplear en los tratamientos para el patógeno *Phytophthora capsici*, puesto que ambos presentaron una inhibición superior al 70% en los ensayos en placa al aplicarlos a una concentración de 25 mM. Si bien a 100 μ M otros compuestos eran igualmente efectivos, llegando a observándose resultados ligeramente positivos en el caso de Botrytis, es probable que debido a esta concentración la toxicidad de los compuestos sea demasiado elevada como para poderlos aplicar en agricultura.

La gravedad de los síntomas de la infección fue cuantificada según los criterios explicados en el apartado 3.2.3., incluyendo la escala de valores para raíces y hojas y la longitud de la necrosis en el tallo. Los resultados se expresan como los valores del promedio del parámetro AUDPC (*Area Under the Disease Progression Curve*, esto es, la integral definida entre 0 y t de la curva que surge al representar la progresión de los síntomas a lo largo de t días) a los 12 días posteriores a la inoculación del patógeno.

Como se puede observar en la Figura 13, la severidad de la enfermedad definida según la escala de valores para los síntomas de la infección presenta un valor menor en la aplicación sobre las hojas del tratamiento con **L4** respecto al control, mientras que fue mayor en el tratamiento con **C4**. El método de aplicación en raíz no presenta reducción en la gravedad de los síntomas en ninguno de los tratamientos.

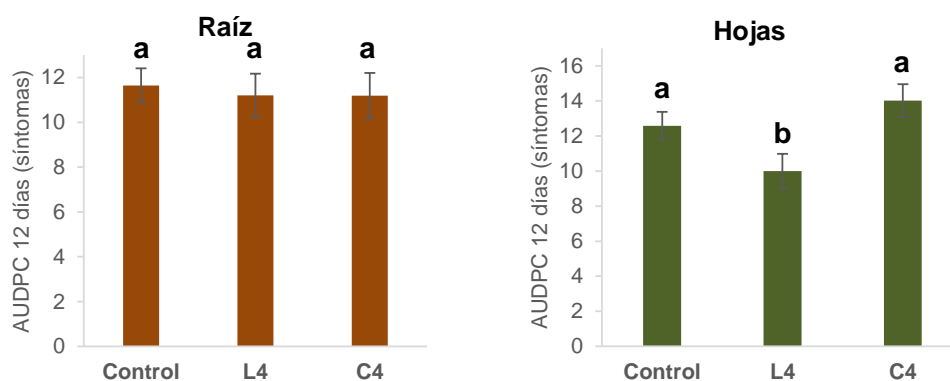


Figura 13: Representación gráfica de la media del AUDPC a los 12 días y su error estándar para la escala de síntomas según el método de aplicación del tratamiento, en raíz (izda) u hojas (dcha). Los tratamientos con una letra distinta indican diferencias significativas en el test de Newman-Keuls ($\alpha = 0,05$)

Los datos tomados de cada tratamiento fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre el control y los dos tratamientos. El valor p es de 0,9241 para los resultados de la aplicación por raíz (no hay diferencias estadísticamente significativas), mientras que para la aplicación en hojas es de 0,0090 (sí hay diferencias significativas).

Las comparaciones múltiples se realizaron mediante el test de Newman-Keuls, que indicó que existen diferencias estadísticamente significativas, al 95% de confianza, entre la media del tratamiento **L4** en las hojas, y las de su control y el tratamiento **C4**. El tratamiento **C4** no se diferenció del control (Figura 13).

Asimismo, se realizó el mismo tratamiento de los datos tomados sobre la longitud de la lesión de necrosis en el tallo (Figura 14). El análisis de la varianza permite concluir que no hay diferencias significativas, al 95% de confianza, entre las medias de los distintos tratamientos en el ensayo con aplicación por raíz (valor $p = 0,1512$), pero sí en el ensayo con aplicación en hojas (valor $p = 0,0189$).

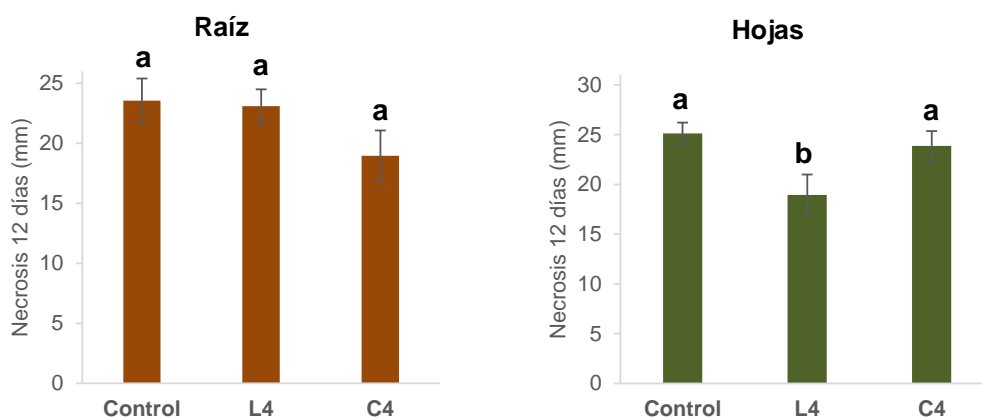


Figura 14: Representación gráfica de la media con su error estándar de la necrosis a los 12 días (en mm) según el método de aplicación del tratamiento, raíz (izda) u hojas (dcha). Los tratamientos con una letra distinta indican diferencias significativas en el test de Newman-Keuls ($\alpha = 0,05$)

Según el resultado del test de Newman-Keuls, la media del control y la del tratamiento con **L4** (así como entre este y **C4**) al ser aplicados en las hojas presentan diferencias estadísticamente significativas, al 95% de confianza, de la necrosis en el tallo. Esto no ocurre en la aplicación de los tratamientos a través de la raíz, ya que, si bien parece que **C4** es efectivo aplicado de este modo, el test ANOVA descartó que sea estadísticamente diferente al control.

Dado que la aplicación sobre las hojas del tratamiento con **L4** causa, de un modo estadísticamente significativo, una reducción de los síntomas de la infección con *Phytophthora capsici*, este compuesto se propone como buen candidato a ser empleado como agente fitosanitario.

La diferencia existente entre **L4** y **C4** en cuanto a su capacidad de reducir la severidad de los síntomas de la infección permite establecer que la actividad biológica de estos compuestos depende de si se encuentra el ligando libre o de si está coordinado a un metal. Esto podría ser debido a que el mecanismo de acción de este tipo de compuestos se basa en la quelación de metales de gran importancia para el metabolismo celular, impidiendo la proliferación de patógenos. Según lo indicado en estudios recientes con complejos derivados de tiosemicarbazonas, el aumento o

disminución de la actividad biológica respecto al ligando libre depende de un gran número de factores estructurales, así como de cada tipo de microorganismo [33] [34].

Es bien sabido que el tratamiento de plantas con diferentes agentes como productos químicos, extractos de plantas o distintos patógenos puede resultar en la inducción de resistencia a futuros ataques de patógenos, tanto de manera local como sistémica [35]. En estos ensayos se observa una reducción en la severidad de los síntomas de la enfermedad y, según estudios recientes en el campo de la fitopatología, la inducción de resistencia rara vez implica un control completo de la posterior infección [36].

Los fenómenos de resistencia inducida pueden ser incluidos en dos categorías, la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR). La SAR se desarrolla en respuesta a una infección o un tratamiento con agentes químicos y es efectiva ante un amplio rango de patógenos, estando mediado el proceso por el ácido salicílico. Por otro lado, la ISR tiene lugar tras la colonización de las raíces por parte de rizobacterias capaces de promover el crecimiento de la planta, a través de rutas de señalización dependientes de jasmonatos o del etileno. Si bien sus efectos visibles pueden ser similares, los mecanismos de defensa y su eficacia pueden diferir entre una y otra [35].

De acuerdo con estudios recientes, ante un mismo agente inductor, el mecanismo de inducción varía considerablemente entre diferentes especies de plantas, tanto a nivel de hormonas involucradas como de rutas de señalización, llegando a conferir resistencia frente a diferentes patógenos. Además, dicho agente puede generar resistencia frente a diferentes especies patógenas, por lo que existe la posibilidad de que los compuestos ensayados en estos experimentos puedan inducir resistencia frente a *B. cinerea* a pesar de haber mostrado una menor eficacia en los ensayos de inhibición del crecimiento [36].

La aplicación sobre las hojas sí fue efectiva a pesar de no serlo desde la raíz, por lo que es altamente probable que haya tenido lugar la inducción de resistencia en la planta huésped. Esto es explicable en tanto que es improbable que puedan transportar estos compuestos hacia la raíz en cantidades suficientes como para provocar en ellas la inhibición del patógeno, pues la cantidad de compuesto que puede entrar por las hojas (a través de los estomas o la epidermis) es muy pequeña. Es más probable que

la aplicación en las hojas desencadene el desarrollo de mecanismos de defensa ante patógenos que tienen efecto en el resto del organismo (inducción de resistencia sistémica).

Dadas las propiedades de los ligandos semicarbazona y tiosemicarbazona como agentes quelantes, la deficiencia de hierro que podrían estar provocando en la planta concuerda con los resultados de estudios recientes en los que disminuir la disponibilidad de dicho metal da lugar a una mayor eficacia en la defensa ante patógenos [21] [32].

Conseguir un control de las enfermedades de las plantas mediante mecanismos de defensa propios de la planta con la síntesis de nuevos compuestos capaces de inducir resistencia es uno de los principales objetivos actuales en la investigación en el campo de la fitopatología [35].

Por último, no se observaron síntomas de fitotoxicidad (tales como clorosis) durante el ensayo, incluyendo los 6 días transcurridos entre la inoculación del patógeno y la aparición de los síntomas característicos de su infección, ampliando las posibilidades de aplicación de este compuesto en tanto que no es perjudicial para todos los organismos [37].

5. Conclusiones

Según los resultados obtenidos en los ensayos realizados y atendiendo a los objetivos planteados, se concluye que:

1. Los compuestos semicarbazona y tiosemicarbazona ensayados son capaces de causar inhibición del crecimiento del hongo patógeno *Botrytis cinerea* y el oomiceto patógeno *Phytophthora capsici*. Su efecto fue mayor en este último, siendo **L4** y **C4** los compuestos más efectivos.
2. El compuesto **L4** es eficaz para proteger parcialmente a la planta de pimiento frente a *Phytophthora capsici* cuando se aplica a las hojas, pero no por aplicación a las raíces. El compuesto **C4** no fue efectivo en planta.

Conclusión

Segundo os resultados obtidos nos ensaios realizados e atendendo aos obxectivos expostos, conclúese que:

1. Os compostos semicarbazona e tiosemicarbazona ensaiados son capaces de causar inhibición do crecemento do fungo patóxeno *Botrytis cinerea* e o oomiceto patóxeno *Phytophthora capsici*. O seu efecto foi maior neste último, sendo **L4** e **C4** os compostos máis efectivos.
2. O composto **L4** é eficaz para protexer parcialmente á planta de pemento fronte a *Phytophthora capsici* cando se aplica ás follas, pero non por aplicación ás raíces. O composto **C4** non foi efectivo en planta.

Conclusions

According to the results obtained in the experiments carried out and attending to the objectives of this study, it is concluded that:

1. The semicarbazone and thiosemicarbazone compounds tested are able to inhibit the growth of the pathogenic fungus *Botrytis cinerea* and the pathogenic oomycete

Phytophthora capsici. Their effect was greater in the latter, with **L4** and **C4** being the most effective compounds.

2. The compound **L4** is effective to partially protect the pepper plant against *Phytophthora capsici* when applied to the leaves, but not by application to the roots. The compound **C4** was not effective on the plant.

Bibliografía

- [1] 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.
- [2] Díaz González TE, Fernández-Carvajal Álvarez MC, Fernández Prieto JA. (2004). Curso de botánica. Ediciones Trea, S.L; Asturias.
- [3] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Cultivos y productos de ganadería. Chiles, pimientos picantes, pimientos (verdes) 2019. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize> (consultado el 1 de septiembre de 2021).
- [4] Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JAL. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 561–580.
- [5] Veloso J, van Kan JAL. (2018). Many shades of grey in *botrytis*-host plant interactions. *Trends in Plant Science*, 23, 613-622.
- [6] Nelson S. *Botrytis* blight of peach, pathogen: *Botrytis cinerea* (fungus) 2017. <https://www.flickr.com/photos/62295966@N07/35444989152> (consultado el 6 de septiembre de 2021).
- [7] Vinoble Jerez. *Botrytis cinerea*: la podredumbre noble 2020. <https://www.vinoble.org/blog/botrytis-cinerea-la-podredumbre-noble> (consultado el 1 de septiembre de 2021).
- [8] 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.
- [9] Agrios GN. (2005). *Plant Pathology* (5ª ed.). Academic Press.
- [10] McGrath M. *Phytophthora* blight on peppers 2021. <https://blogs.cornell.edu/liveqpath/gallery/peppers/phytophthora-blight-on-peppers/> (consultado el 7 de septiembre de 2021).
- [11] Guo Z, Li Q, Wang G, Dong F, Zhou H, Zhang J. (2014). Synthesis, characterization, and antifungal activity of novel inulin derivatives with chlorinated benzene. *Carbohydrate Polymers*, 99, 469–473.
- [12] 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.
- [13] Li Q, Tan W, Zhang C, Gu G, Guo Z. (2015). Novel triazolyl-functionalized chitosan derivatives with different chain lengths of aliphatic alcohol substituent: Design, synthesis, and antifungal activity. *Carbohydrate Research*, 418, 44–49.
- [14] Liu W, Qin Y, Liu S, Xing R, Yu H, Chen X, et al. (2018). Synthesis, characterization and antifungal efficacy of chitosan derivatives with triple quaternary ammonium groups. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 942–949.
- [15] Anush SM, Vishalakshi B, Kalluraya B, Manju N. (2018). Synthesis of pyrazole-based Schiff bases of Chitosan: Evaluation of antimicrobial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 446–452.

- [16] Casas JS, García-Tasende MS, Sordo J. (2000). Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. *Coordination Chemistry Review*, 209, 197–261.
- [17] Lambert C, Beraldo H, Lievre N, Garnier-Suillerot A, Dorlet P, Salerno M. (2013). Bis(thiosemicarbazone) copper complexes: mechanism of intracellular accumulation. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18, 59–69.
- [18] Chandra S, Gupta LK. (2005). Spectroscopic and biological studies on newly synthesized nickel(II) complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. *Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 62, 1089–1094.
- [19] Afrasiabi Z, Sinn E, Lin W, Ma Y, Campana C, Padhye S. (2005). Nickel (II) complexes of naphthaquinone thiosemicarbazone and semicarbazone: Synthesis, structure, spectroscopy, and biological activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 1526–1531.
- [20] Rodríguez-Argüelles MC, Mosquera-Vázquez S, Sanmartín-Matalobos J, García-Deibe AM, Pelizzi C, Zani F. (2010). Evaluation of the antimicrobial activity of some chloro complexes of imidazole-2-carbaldehyde semicarbazone: X-ray crystal structure of cis-NiCl₂(H₂L)(H₂O). *Polyhedron*, 29, 864–870.
- [21] Alomar K, Gaumet V, Allain M, Bouet G, Landreau A. (2012). Synthesis, crystal structure, characterisation, and antifungal activity of 3-thiophene aldehyde semicarbazone (3STCH), 2,3-thiophene dicarboxaldehyde bis(semicarbazone) (2,3BSTCH₂) and their nickel (II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 115, 36–43.
- [22] Pérez-Rebolledo A, Piro OE, Castellano EE, Teixeira LR, Batista AA, Beraldo H. (2006). Metal complexes of 2-benzoylpyridine semicarbazone: Spectral, electrochemical and structural studies. *Journal of Molecular Structure*, 794, 18–23.
- [23] Otero L, Noblia P, Gambino D, Cerecetto H, González M, Ellena JA, *et al.* (2003) Synthesis and characterization of new ruthenium complexes with active ligands against Chagas' disease. *Inorganica Chimica Acta*, 344, 85–94.
- [24] Aly MM, Mohamed YA, El-Bayouki KAM, Basyouni WM, Abbas SY. (2010). Synthesis of some new 4(3H)-quinazolinone-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their metal complexes and a study on their anticonvulsant, analgesic, cytotoxic and antimicrobial activities -- Part-1. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 3365–3373.
- [25] Chohan ZH, Pervez H, Khan KM, Supuran CT. (2008). Organometallic-based antibacterial and antifungal compounds: transition metal complexes of 1,1'-diacetylferrocene-derived thiocarbohydrazone, carbohydrazone, thiosemicarbazone and semicarbazone. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 81–89.
- [26] Khazi IM, Koti RS, Chadha MV, Mahajanshetti CS, Gadad AK. (2005). Synthesis and evaluation of the antibacterial and antitubercular activity of some N¹-aral-N⁴-(3-chloro-4-fluorophenyl) thiosemicarbazones and their copper(I) complexes. *Arzneimittelforschung*, 55, 107–113.
- [27] Varadinova T, Kovala-Demertzi D, Rupelieva M, Demertzis M, Genova P. (2001). Antiviral activity of platinum (II) and palladium (II) complexes of pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazone. *Acta Virologica*, 45, 87–94.

- [28] Walcourt A, Loyevsky M, Lovejoy DB, Gordeuk VR, Richardson DR. (2004). Novel aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators with anti-malarial activity against chloroquine-resistant and -sensitive parasites. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36, 401–407.
- [29] Bharti N, Shailendra, Sharma S, Naqvi F, Azam A. (2003). New palladium(II) complexes of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones: synthesis, spectral studies and *in vitro* anti-amoebic activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11, 2923–2929.
- [30] Kalinowski DS, Richardson DR. (2005). The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, 57, 547–583.
- [31] Le NTV, Richardson DR. (2004). Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood*, 104, 2967–2975.
- [32] Trapet PL, Verbon EH, Bosma RR, Voordendag K, Van Pelt JA, Pieterse CMJ. (2021). Mechanisms underlying iron deficiency-induced resistance against pathogens with different lifestyles. *Journal of Experimental Botany*, 72, 2231–2241.
- [33] Kasuga NC, Sekino K, Ishikawa M, Honda A, Yokoyama M, Nakano S, *et al.* (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.
- [34] Degola F, Morcia C, Bisceglie F, Mussi F, Tumino G, Ghizzoni R, *et al.* (2015). In vitro evaluation of the activity of thiosemicarbazone derivatives against mycotoxigenic fungi affecting cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 104–111.
- [35] De Kesel J, Conrath U, Flors V, Luna E, Mageroy MH, Mauch-Mani B, *et al.* (2021). The induced resistance lexicon: Do's and don't's. *Trends in Plant Science*, 26, 685–691.
- [36] Veloso J, Díaz J. (2021). The non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 induces distinct responses in two closely related Solanaceae plants against the pathogen *Verticillium dahliae*. *Journal of Fungi*, 7, 344.
- [37] Durán Quirós A, Mora Acedo D, Ramírez Ortiz L. (1999). Enfermedades y otros problemas de las plantas. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.