



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Ensayo *in vitro* e *in planta* de la actividad fitosanitaria de complejos de zinc(II) con ligandos tiosemicarbazona

Ensaio *in vitro* e *in planta* da actividade fitosanitaria de complexos de zinc(II) con ligandos tiosemicarbazona

In vitro and *in planta* assay of the phytosanitary activity of zinc(II) complexes with thiosemicarbazone ligands

Clara Martín Jiménez

Curso: 2022 – 2023

Convocatoria: Setembro

Directores: José Díaz Varela
Néstor Carrillo Barral

ÍNDICE

RESUMEN	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. IMPORTANCIA DE LOS FUNGICIDAS	6
1.2. PLANTA HUÉSPED: <i>Cucurbita pepo</i> L.	7
1.3. PATÓGENOS	9
1.3.1. <i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr	9
1.3.2. <i>Phytophthora capsici</i> Leon.	10
1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS TIOSEMICARBAZONAS	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	13
3.2. COMPUESTOS A ENSAYAR	13
3.3. ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>B. cinerea</i> y <i>P. capsici</i>	14
3.3.1. EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN EN PLACA	14
3.3.2. EXPERIMENTO DE INHIBICIÓN EN PLANTA	15
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN EN PLACA	18
4.2. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN EN PLANTA	25
CONCLUSIONES	28
CONCLUSIÓNS	28
CONCLUSIONS	28
BIBLIOGRAFÍA	29

RESUMEN

El aumento de la población mundial, y, por tanto, el incremento en la demanda de alimentos obtenidos mediante el monocultivo fomentan la aparición de epidemias de enfermedades fúngicas que provocan pérdidas importantes en los cultivos. Esto, y la aparición de cepas de ciertos patógenos resistentes a los pesticidas clásicos, hace necesario un continuo desarrollo de nuevos productos fitosanitarios.

Debido a las interesantes actividades biológicas que presentan las tiosemicarbazonas y sus complejos metálicos, en el presente Trabajo de Fin de Grado se ha estudiado la potencial actividad fitosanitaria de algunos compuestos de estos grupos.

Por un lado, se ha medido la capacidad de algunas tiosemicarbazonas y sus complejos de zinc(II) para inhibir el crecimiento de los patógenos *Botrytis cinerea* y *Phytophthora capsici*. Por otro lado, se ha determinado la capacidad fitosanitaria *in planta* de esos compuestos usando *Cucurbita pepo* como huésped de los patógenos anteriores.

Estos experimentos mostraron diferencias en la inhibición del crecimiento en función de los compuestos ensayados y del patógeno utilizado. De hecho, los resultados de un complejo en concreto mostraron evidencias de resistencia inducida en planta.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*, *Cucurbita pepo*, patógeno, fitosanitario, tiosemicarbazona

RESUMO

O aumento da poboación mundial, e, polo tanto, o incremento na demanda de alimentos obtidos mediante o monocultivo fomentan a aparición de epidemias de enfermidades fúnxicas que provocan perdas importantes nos cultivos. Isto, e a aparición de cepas de certos patóxenos resistentes aos pesticidas clásicos, fai necesario un continuo desenvolvemento de novos produtos fitosanitarios.

Debido ás interesantes actividades biolóxicas que presentan as tiosemicarbazonas e os seus complexos metálicos, no presente Traballo de Fin de Grao estudouse a potencial actividade fitosanitaria dalgúns compostos destes grupos.

En primeiro lugar, mediuse a capacidade dalgunhas tiosemicarbazonas e os seus complexos de zinc(II) para inhibir o crecemento dos patóxenos *Botrytis cinerea* e *Phytophthora capsici*. En segundo lugar, determinouse a capacidade fitosanitaria *in planta* deses compostos usando *Cucurbita pepo* como hóspede dos patóxenos anteriores.

Estes experimentos mostraron diferenzas na inhibición do crecemento dependendo dos compostos ensaiados e do patóxeno utilizado. De feito, os resultados dun complexo en concreto mostraron evidencias de resistencia inducida na planta.

Palabras chave: *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*, *Cucurbita pepo*, patóxeno, fitosanitario, tiosemicarbazona

ABSTRACT

The increase in world population and, therefore, the rise in the demand for food obtained through monoculture triggers the appearance of epidemics of fungal diseases that cause significant crop losses. This fact, and the appearance of pathogens strains resistant to classic pesticides, makes necessary to continuously develop new phytosanitary products.

Due to the interesting biological activities of thiosemicarbazones and their metal complexes, in this Final Degree Project we have studied the potential phytosanitary activity of some compounds of these groups.

On one hand, the capacity of some thiosemicarbazones and their zinc(II) complexes for inhibiting the growth of the pathogens *Botrytis cinerea* and *Phytophthora capsici* has been measured. On the other side, the *in planta* phytosanitary capacity of these compounds has been determined using *Cucurbita pepo* as a host for the pathogens mentioned above.

These experiments showed differences in growth inhibition depending on the compounds tested and the pathogen used. In fact, the results for one particular complex showed signs of induced resistance in the plant.

Keywords: *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*, *Cucurbita pepo*, pathogen, phytosanitary, thiosemicarbazone.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA DE LOS FUNGICIDAS

Aunque el uso de pesticidas data de la Antigüedad, en la agricultura moderna no solo se ha generalizado el uso de éstos, sino que también se han desarrollado fórmulas más complejas. Uno de los factores que provocaron estos avances fue el aumento de la población mundial, que implicó un incremento en la demanda de alimentos. Debido a que la mayor parte de las pérdidas económicas en cultivos agrícolas por enfermedades de las plantas son causadas por hongos y oomicetos, los fungicidas son uno de los grupos de pesticidas más demandados (1, 2).

Un fungicida se puede definir como un producto de origen natural o sintético que actúa protegiendo las plantas contra la invasión de hongos, u organismos parecidos a ellos como los oomicetos, y/o erradicando las infecciones fúngicas ya establecidas (1).

Durante el s.XIX hubo una serie de incidentes de enfermedades fúngicas con un gran impacto social, como la Gran Hambruna Irlandesa provocada por el oomiceto *Phytophthora infestans*, que causa la enfermedad del mildiu de la patata. Otra producción afectada fue la de la viticultura, por eso, hacia 1885, Millardet inventó el caldo bordelés, una mezcla de sulfato de cobre y cal para el control del mildiu de la uva (1, 2).

Algunos compuestos inorgánicos, como el azufre y el cobre, siguen usándose actualmente bajo el nombre de “sustancias básicas”.

La aparición de epidemias de enfermedades fúngicas se ve favorecida por la agricultura de monocultivo, usada para proporcionar alimento tanto a la población humana como ganadera. Además, la aparición de cepas resistentes a los fungicidas y la necesidad de productos más rentables hace precisa la búsqueda de nuevos y mejores tratamientos (1, 2).

1.2. PLANTA HUÉSPED: *Cucurbita pepo* L.

Cucurbita pepo es una planta de cultivo de la familia Cucurbitaceae. Esta planta produce una gran variedad de frutos que se diferencian por su morfología, pero las variedades más extendidas pertenecen a la subespecie *Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo*. Estas diferencias se deben a su gran capacidad de hibridación y su amplia distribución geográfica. Este cultivo es común en áreas de climas templados y fríos.

Las plantas son herbáceas y rastreras, de aspecto áspero, con tallos acanalados, hojas lobuladas de márgenes serrados con flores grandes de color amarillo y unisexuales (*Figura 1*).

Además de por su interés agrícola, en este trabajo se ha seleccionado el calabacín como planta huésped por ser una planta de amplia distribución y crecimiento rápido, con hojas amplias que facilitan la inoculación y la medición de los síntomas.



Figura 1. Planta del calabacín. Fuente:

https://es.wikipedia.org/wiki/Cucurbita_pepo#/media/Archivo:0.2014_Cucurbita_pepo_subsp._pepo_convar._giromontina_-_Sanok.JPG

En 2021, China Continental fue el principal productor de variedades de calabaza y calabacín con un promedio de 7 millones de toneladas, seguida por Ucrania y la Federación de Rusia con poco más de 1 millón de toneladas cada uno (*Figura 2*). Prácticamente la mitad de la producción media global de estos productos proviene de Asia (*Figura 3*)⁽³⁾.

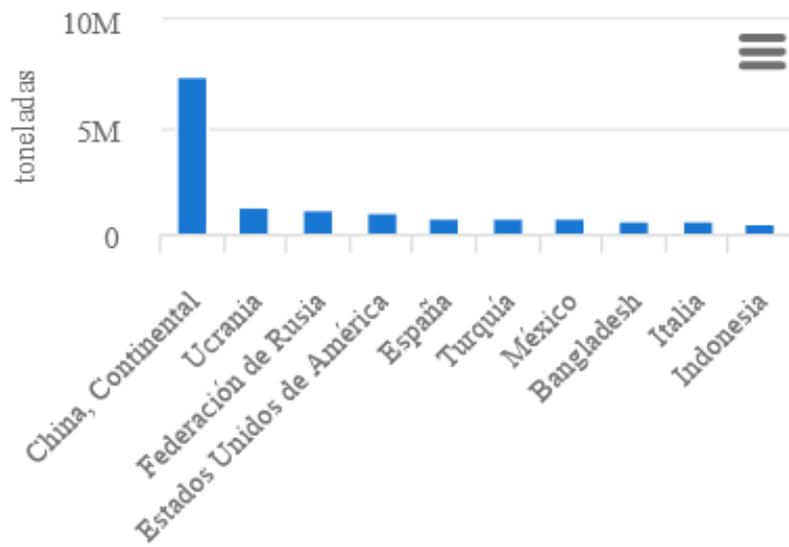


Figura 2. Principales productores de variedades de calabaza y calabacín a nivel global en el año 2021. Fuente: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>

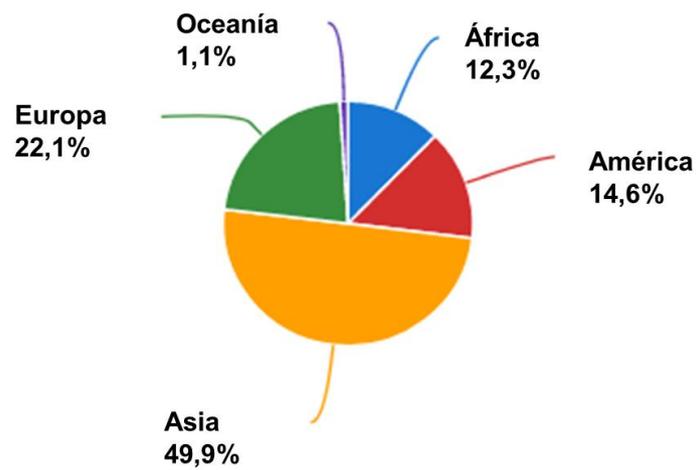


Figura 3. Distribución geográfica promedio en porcentaje de la producción de variedades de calabaza y calabacín a nivel global en el año 2021. Fuente: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>

1.3. PATÓGENOS

1.3.1. *Botrytis cinerea* Pers.:Fr

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno y necrótrofo de transmisión aérea que causa la podredumbre gris y que ataca a más de 1000 especies vegetales, incluidos cultivos de importancia económica, y que se desarrolla en climas suaves y húmedos ⁽⁴⁾.

Este hongo puede llamarse de diferentes maneras dependiendo del estado en el que se encuentre, es decir, si está en forma asexual (anamorfo) se denomina *Botrytis cinerea*, y si se encuentra en forma sexual (teleomorfo) se pasaría a llamar *Botrytis fuckeliana* Whetzel. Este último estado es muy poco habitual, por lo que el nombre más extendido es el de *Botrytis cinerea* ⁽⁴⁾.

Se considera que el principal impacto del hongo se da en la producción de fresas y en la viticultura, aunque también afecta a otros frutales, hortalizas, plantas ornamentales, etc. (Figura 4), y a los cultivos de plantas fuera de temporada en invernaderos, aumentando enormemente el riesgo de infección ⁽⁵⁾.

B. cinerea es responsable de una amplia gama de síntomas. Puede infectar a hojas, tallos, flores y frutos en cualquier fase de desarrollo de la planta. Los órganos infectados se vuelven necróticos, con una intensa esporulación, formando masas de conidios de color gris, que caracteriza a la enfermedad. Puede seguir infectando a la planta y los huéspedes circundantes durante la temporada de crecimiento ⁽⁶⁾.



Figura 4. Fresa (izq.), vid (centro) y calabacín (dcha.) afectados por *Botrytis cinerea*. Fuente: https://es.wikipedia.org/wiki/Botrytis_cinerea (izq.), <https://www.agroes.es/cultivos-agricultura/vid-vino-bodegas/vid-cultivo/42-botrytis-podredumbre-gris> (centro), https://www.infoagro.com/documentos/images/1791.asp?foto=fig_12_plantas_de_calabacin_cucurbita_pepo_l_en_el_campo_afectadas_por_la_enfermedad (dcha.)

1.3.2. *Phytophthora capsici* Leon.

Phytophthora capsici es un oomiceto fitopatógeno y hemibiotrofo que causa enfermedades en una amplia gama de huéspedes, fundamentalmente de las familias Solanaceae, Cucurbitaceae, y Fabaceae ⁽⁷⁾.

Los síntomas causados por *P. capsici* pueden aparecer en las zonas bajas de las plantas, asociados a la acumulación de agua. En pimiento causa sobre todo podredumbre de la raíz, algo que también se da en otros huéspedes. También provoca la pudrición de tallos y frutos. En general, los frutos de cucurbitáceas infectados muestran inicialmente lesiones oscuras y húmedas, seguidas de una distintiva capa blanca de esporas en su superficie (Figura 5) ^(7, 8).

El control de las enfermedades causadas por *P. capsici* está actualmente limitado por la supervivencia en el suelo del patógeno a largo plazo en forma de oosporas y su movimiento por las aguas superficiales de riego, una amplia gama de hospedadores, la presencia de poblaciones de patógenos resistentes a los fungicidas y la falta de variedades resistentes de los hospedadores ⁽⁹⁾.



Figura 5. Calabaza (izq.) y calabacín (dcha.) afectados por *Phytophthora capsici*. Fuente: <https://cuccap.org/espanol/infeccion-de-phytophthora/>

1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS TIOSEMICARBAZONAS

Desde hace tiempo se buscan agentes antifúngicos que contengan metales como futuros fármacos, por lo que se estudian las actividades fungicidas de varios compuestos orgánicos, como es el caso de las tiosemicarbazonas, y de sus complejos metálicos ⁽¹⁰⁾. En el ámbito de la agricultura el uso de tiosemicarbazonas ha despertado un particular interés en la protección de cultivos.

Las tiosemicarbazonas (*Figura 6*) son consideradas interesantes debido a su química y su actividad biológica potencialmente beneficiosa, ya sea como antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoaria y antimalárica. Estas actividades biológicas difieren si el ligando está libre o unido a un metal formando un complejo y se consideran debidas a su capacidad para formar quelatos con los metales.

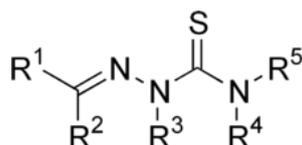


Figura 6. Estructura general de una tiosemicarbazona

Recientes investigaciones han demostrado que la presencia de un átomo de nitrógeno adicional incrementa la citotoxicidad del complejo tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto se consigue con tiosemicarbazonas con N-heterociclos, como la piridina, que utilizan un sistema dador [N, N, S] en la formación del complejo (*Figura 7*).

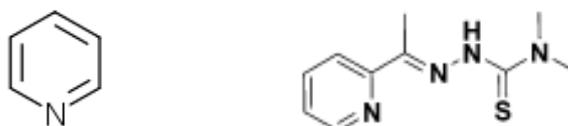


Figura 7. Estructura de una piridina (izq.). Ejemplo de una tiosemicarbazona con un sustituyente piridinico. Fuente: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00238> (dcha.)

Las actividades biológicas dependen significativamente de los iones metálicos centrales (*Figura 8*) ^(11, 12, 13, 14)

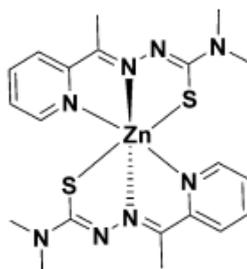


Figura 8. Ejemplo de un complejo metálico de Zn(II) con tiosemicarbazonas. Fuente: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00238>

En la actualidad, el mecanismo de acción asociado a las tiosemicarbazonas y sus complejos metálicos está muy poco explorado y continua en debate. Algunos resultados señalan la capacidad de tiosemicarbazonas específicas para actuar como agentes antioxidantes, mientras que otros estudios indican que ciertas tiosemicarbazonas interfieren en la biogénesis de la membrana plasmática y/o en su composición ⁽¹⁵⁾.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado en Biología es verificar la potencial actividad fitosanitaria de compuestos tiosemicarbazona y complejos de zinc(II) derivados de tiosemicarbazonas, que han sido sintetizados previamente en el Trabajo de Fin de Grado en Química coordinado con este, frente a patógenos de plantas.

Más concretamente se plantea el estudio de,

- 1º. La capacidad de inhibición del crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* y del oomiceto *Phytophthora capsici* por parte de los compuestos de tiosemicarbazonas y los complejos de zinc(II) derivados de aquellos.
- 2º. La eficacia fitosanitaria local y sistémica de los compuestos de tiosemicarbazonas y los complejos de zinc(II) derivados de aquellos, con mejores resultados en el objetivo anterior, en planta de calabacín.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los organismos patógenos se obtuvieron de la colección del grupo de investigación FISAPLANT de la Universidad da Coruña. Concretamente, se usaron los aislados B0510 de *Botrytis cinerea* y Pc450 de *Phytophthora capsici*.

Para los ensayos en planta de calabacín se emplearon plantas comerciales de calabacín adquiridas en Progando (Iñás, Oleiros), dispuestas en bandejas con pocillos rellenos con sustrato vegetal. Estas plantas se cultivaron durante una semana en condiciones fotoperiódicas de 25°C y 16h de luz y 18°C y 8h de oscuridad, para permitir el crecimiento y favorecer que las plantas se aclimaten antes de utilizarlas en los experimentos.

3.2. COMPUESTOS A ENSAYAR

En el presente Trabajo de Fin de Grado se ha estudiado la potencial actividad fitosanitaria de todos los compuestos, tanto ligandos tiosemicarbazona como sus respectivos complejos de zinc(II) (*Figura 9 y 10*), sintetizados en el Trabajo de Fin de Grado de Química *Síntesis de complejos con potencial actividad fitosanitaria* ⁽¹⁶⁾

Todos estos compuestos son sólidos, por lo que se disolvieron en DMSO (dimetilsulfóxido) para su uso.

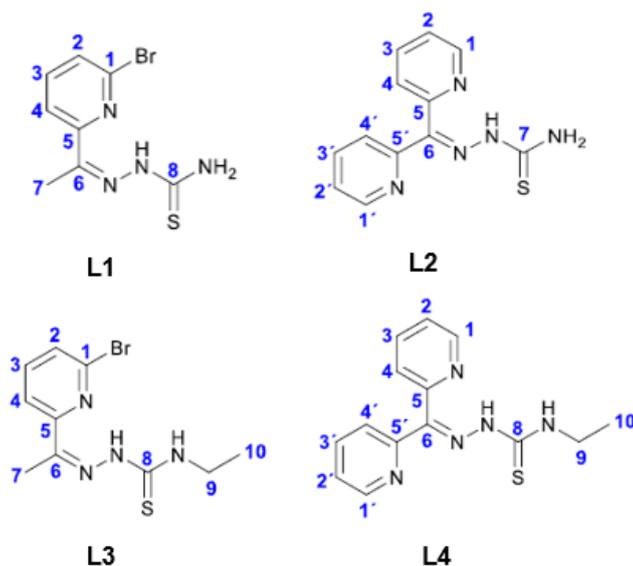


Figura 9. Estructuras de ligandos tiosemicarbazonas a ensayar

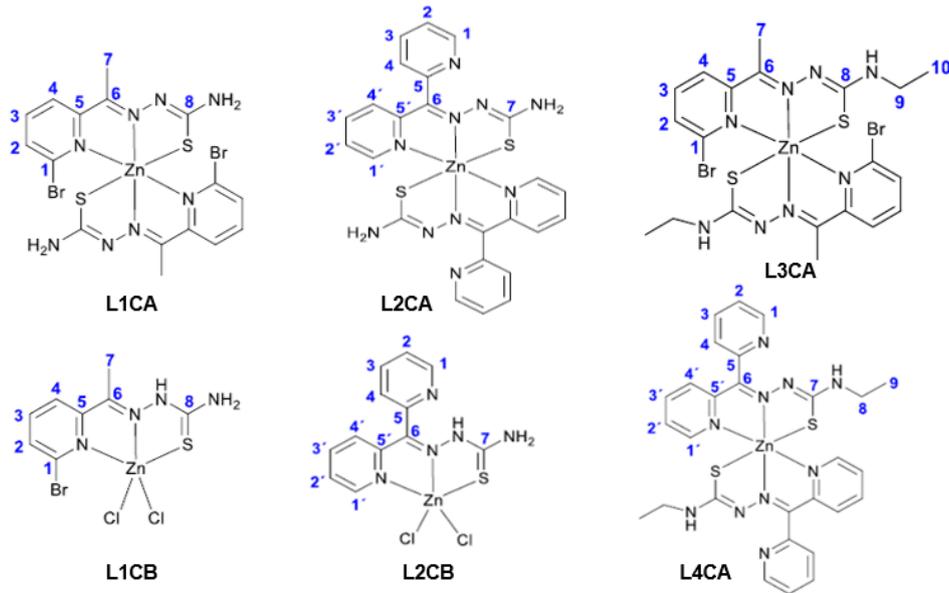


Figura 10. Estructuras de los complejos a ensayar

3.3. ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *B. cinerea* y *P. capsici*

Se realizaron distintos experimentos de cultivo en placa para cada patógeno en presencia de un potencial agente antifúngico y se estudiaron las diferencias en el crecimiento del patógeno con respecto a un control.

Para todos los experimentos se usaron placas Petri con medio sólido PDA (Patata Dextrosa Agar).

El material patógeno se mantuvo mediante repicados periódicos y en cámara de cultivo en condiciones de temperatura de 23°C y fotoperiodo de 8h de oscuridad y 16h de luz, hasta el momento de la inoculación para cada experimento.

La preparación de los medios y el repicado se realizó en condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar horizontal.

3.3.1. EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN EN PLACA

Primero, se realizó un experimento preliminar con todos los compuestos mencionados en el apartado 3.2 tanto para *B. cinerea* como para *P. capsici*, con el fin de comprobar la toxicidad de cada compuesto a una concentración de 25µM.

Los cultivos se prepararon con medio PDA suplementado con los compuestos a ensayar, y DMSO a una concentración final 1:1000 (v/v).

Estos medios de cultivo se vertieron en placas Petri y se mantuvieron en la cámara de flujo laminar horizontal hasta la solidificación del medio. Una vez solidificado, se colocó un disco de micelio de 5mm del patógeno correspondiente en el centro de cada placa. Estas placas también se mantuvieron en cámara de cultivo en las condiciones mencionadas anteriormente.

Para la toma de datos sobre el crecimiento de los patógenos, se midió el diámetro del micelio que creció en placa con un calibre, tomando dos medidas perpendiculares, tras 3 días de cultivo en el caso de *B. cinerea* y tras 4 días de cultivo en el caso de *P. capsici*.

A partir de este ensayo se decidió trabajar solo con el ligando L4 y su complejo de zinc derivado, L4CA, ya que fueron los compuestos con mayor interés por sus resultados en la inhibición del crecimiento de los patógenos.

A continuación, se calculó la ED₅₀, esto es la concentración de un compuesto que es necesaria para inhibir el crecimiento en un 50% en comparación con un control sin tratamiento, de los compuestos L4 y L4CA en los patógenos.

Para *B. cinerea* se realizó un experimento en el que se prepararon distintas placas con concentraciones de 1, 5, 25 y 125µM de los compuestos mencionados; mientras que para *P. capsici* las concentraciones preparadas fueron 1, 5, 12,5, 25 y 125µM.

De todos los experimentos se realizaron dos repeticiones con un total de 8 réplicas por patógeno, compuesto y concentración.

3.3.2. EXPERIMENTO DE INHIBICIÓN EN PLANTA

Los experimentos en planta se realizaron con el patógeno en el que se observó mayor inhibición de su crecimiento, el cual fue *P. capsici*, y con los compuestos que causaron este mayor grado de inhibición, L4 y L4CA.

El experimento se realizó con 24 individuos separados en tres grupos (8 individuos de control, 8 individuos para tratamiento con L4, 8 individuos para

tratamiento con L4CA) en los cuales se midió tanto el efecto local como el efecto sistémico.

Primero se trataron las plantas pulverizando la primera hoja verdadera de cada individuo con la correspondiente solución de tratamiento: 5mL de una disolución control que se preparó añadiendo 20 μ L de DMSO a 100mL de agua, 5mL de una disolución de 25 μ M de L4, o 5mL de una disolución de 25 μ M de L4CA.

Una vez secas las hojas, las plantas se incubaron durante un día en una cámara de cultivo en las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura mencionadas en el apartado 3.1.

Al día siguiente se inocularon, tanto las hojas previamente tratadas (nivel local) como las hojas opuestas (nivel sistémico), con dos discos de micelio de 5mm obtenidos de un cultivo previo de *P. capsici*. Las plantas se incubaron en cajas de plástico con una elevada humedad para favorecer la infección por el patógeno, manteniéndolas de nuevo en la cámara de cultivo durante un día.

A las 24 y 48h se midió, con un calibre, el tamaño de las lesiones formadas tomando dos medidas de diámetro perpendiculares, en las hojas tanto locales como sistémicas (*Figura 11*).



Figura 11. Lesiones producidas por P. capsici en hojas de planta de calabacín tratadas con el complejo L4CA en 1 día (izq.) y en 2 días (dcha.) tras la inoculación

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de un ensayo con fungicidas deben cuantificarse y analizarse estadísticamente. En todos los casos se usó un nivel de confianza del 95%.

Para analizar las diferencias en los datos obtenidos del ensayo preliminar de inhibición en placa se realizó una prueba t-student.

Para el cálculo de la ED₅₀ de los experimentos de inhibición en placa se calculó en primer lugar el porcentaje de inhibición. Para ello se usó la siguiente fórmula,

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Diámetro de colonia del tratamiento}}{\text{Diámetro de colonia del control}} \right) \cdot 100$$

Una vez calculado el porcentaje de inhibición se realizó un ajuste lineal representando los resultados en función del logaritmo de la concentración del tratamiento. La ecuación de la recta resultante permite calcular el valor de la ED₅₀.

Los análisis de los experimentos de inhibición en placa se realizaron usando el programa Microsoft Excel.

Con los datos del experimento de inhibición en planta realizó un ANOVA de una vía.

De haber diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó una prueba de rangos múltiples para determinar qué medias son significativamente diferentes de otras. En este caso se usó la prueba de Bonferroni que realiza una comparación por pares entre los rangos promedio de los tres grupos.

Para estos análisis se usó el programa Statgraphics.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN EN PLACA

En el experimento preliminar se determinó la inhibición provocada por cada compuesto a ensayar a una concentración de 25 μ M sobre el crecimiento de un cultivo de *B. cinerea* y un cultivo de *P. capsici*. Los resultados obtenidos para este primer experimento se muestran en las figuras siguientes (Figura 12, 13 y 14).

En la Figura 12 se observa que, para ambos patógenos, la tiosemicarbazona L1 (Fig 12. A y E) inhibe significativamente el crecimiento, al contrario que la tiosemicarbazona L2 (Fig 12. B y F), que no produce inhibición.

En el caso de la tiosemicarbazona L3 (Fig 12. C y G) ésta solo produce inhibición para el hongo, pero no para el oomiceto. Y lo contrario pasa con la tiosemicarbazona L4 (Fig 12. D y H), que no provoca inhibición para el hongo, pero sí para el oomiceto.

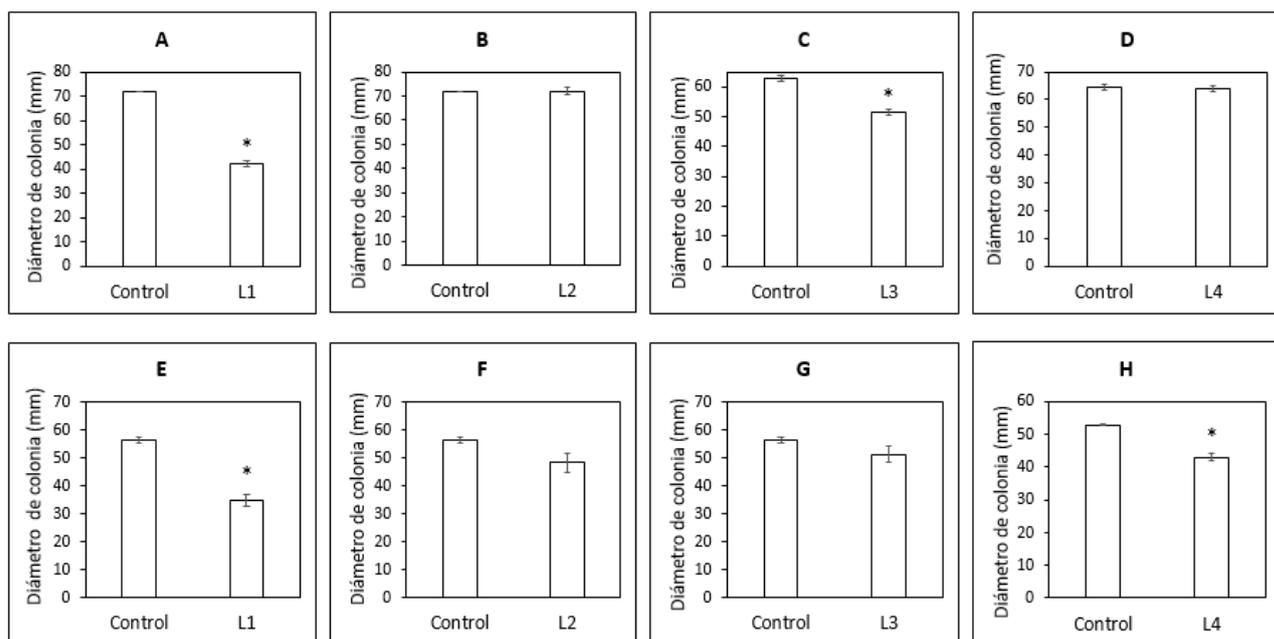


Figura 12. Efecto de los ligandos tiosemicarbazona en el crecimiento micelar de *B. cinerea* (A-D) y *P. capsici* (E-H). L1: gráficas A y E; L2: gráficas B y F; L3: gráficas C y G; L4: gráficas D y H. Datos del promedio \pm error estándar ($n = 8$). El asterisco indica diferencias significativas con el control en un test t-student ($\alpha = 0,05$)

En la *Figura 13*, que muestra los resultados de los complejos metálicos para *B. cinerea*, se observa que L1CA (*Fig. 13 A*) y L1CB (*Fig. 13 D*), derivados del ligando L1, inhiben significativamente el crecimiento en placa. También el L3CA (*Fig. 13 C*), derivado del ligando L3, causa inhibición del crecimiento. Estos resultados muestran que estos compuestos poseen actividad antifúngica *in vitro* tanto como ligandos libres como complejados, es decir, este resultado demuestra que la capacidad de inhibición del crecimiento se mantiene cuando la tiosemicarbazona se une al metal zinc(II) formando un complejo.

Sin embargo, los complejos L2CA (*Fig. 13 B*) y L2CB (*Fig. 13 E*), derivados del ligando L2, no provocan inhibición del crecimiento en placa. Aunque la tiosemicarbazona se haya unido al zinc(II) no se produce un cambio en su capacidad de inhibición del crecimiento.

Por otra parte, con el complejo L4CA (*Fig. 13 F*), derivado del ligando L4, también se observa inhibición, lo que quiere decir que cuando se compleja esta tiosemicarbazona con el zinc(II) se forma un compuesto con una mayor actividad de inhibición del crecimiento comparada con la tiosemicarbazona libre, que no produce inhibición. Por lo tanto, la presencia del zinc(II) en este compuesto provoca inhibición del crecimiento.

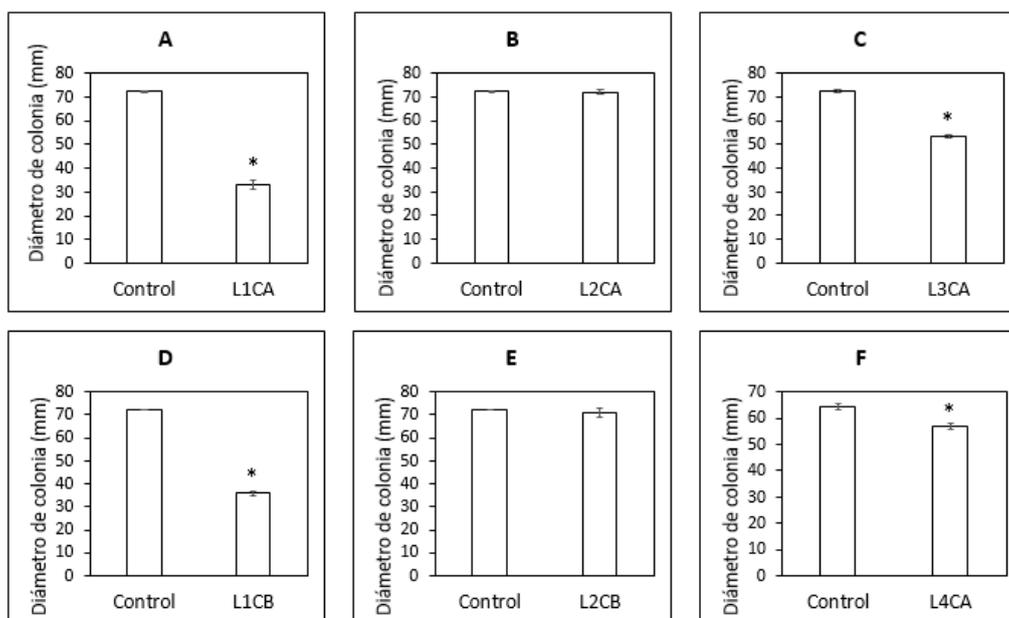


Figura 13. Efecto de los complejos en el crecimiento micelial de B. cinerea (A-F). L1CA: gráfica A; L2CA: gráfica B; L3CA: gráfica C; L1CB: gráfica D; L2CB: gráfica E; L4CA: gráfica F. Datos del promedio \pm error estándar ($n = 8$). El asterisco indica diferencias significativas con el control en un test t-student ($\alpha = 0,05$).

En la *Figura 14*, que muestra los resultados de los complejos para *P. capsici*, se observa que L1CA (*Fig. 14 A*) y L1CB (*Fig. 14 D*), derivados del ligando L1, causan inhibición significativa del crecimiento en placa. De nuevo, estos resultados muestran que estos compuestos poseen actividad antifúngica *in vitro* tanto como ligandos libres como complejados con zinc(II).

Como en el caso anterior, los complejos L2CA (*Fig. 14 B*) y L2CB (*Fig. 14 E*), derivados del ligando L2, no provocan inhibición del crecimiento en placa. La presencia del zinc(II) en el compuesto no cambia la capacidad de inhibición del crecimiento.

Para el caso del complejo L3CA (*Fig. 14 C*), derivado del ligando L3, se advierte inhibición del crecimiento, lo que quiere decir que cuando se compleja esta tiosemicarbazona con el zinc(II) se forma un compuesto con una mayor actividad de inhibición del crecimiento comparada con la tiosemicarbazona libre, que no inhibe. De nuevo ocurre que la presencia del metal provoca inhibición del crecimiento.

Por otra parte, para el complejo L4CA (*Fig. 14 F*), derivado del ligando L4, se percibe una inhibición del crecimiento significativamente mayor que para el ligando libre. Este efecto también es significativamente mayor que sobre *B. cinerea*. Por tanto, la tiosemicarbazona complejada con el zinc(II) tiene mayor actividad de inhibición del crecimiento y esta actividad podría ser específica para el oomiceto.

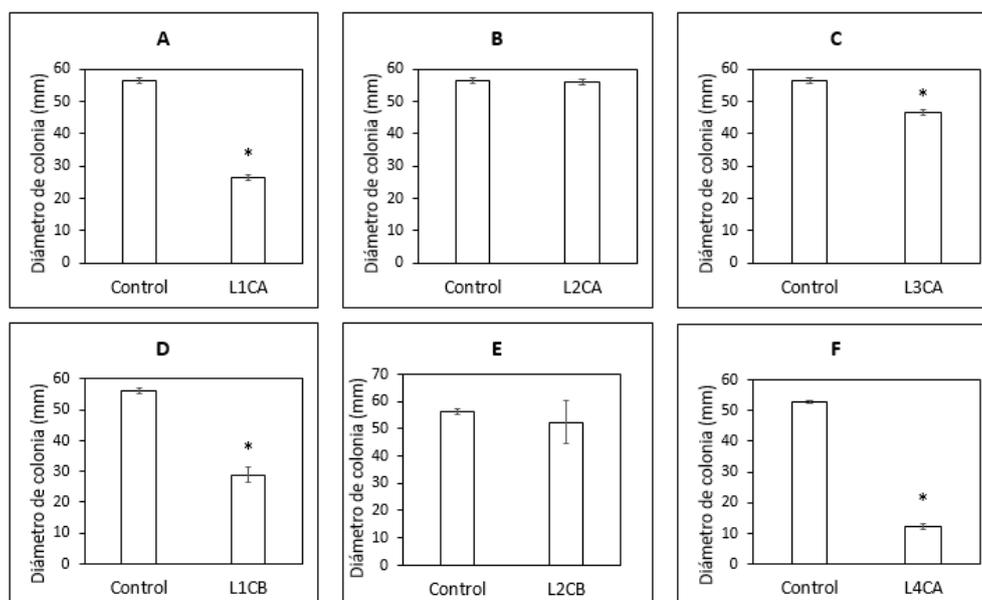


Figura 14. Efecto de los complejos en el crecimiento micelar de *P. capsici* (A-F). L1CA: gráfica A; L2CA: gráfica B; L3CA: gráfica C; L1CB: gráfica D; L2CB: gráfica E; L4CA: gráfica F. Datos del promedio \pm error estándar ($n = 8$). El asterisco indica diferencias significativas con el control en un test *t*-student ($\alpha = 0,05$).

Estos resultados concuerdan con varios estudios que han evaluado la actividad antifúngica de tiosemicarbazonas. En ellos se ha comprobado que estos compuestos presentan actividad inhibitoria del crecimiento celular y que dicha actividad se incrementa cuando las tiosemicarbazonas forman complejos con iones metálicos ⁽¹⁷⁾.

Además, los compuestos que contienen piridinas, como los compuestos ensayados, parecen tener una mayor actividad biológica que aquellos compuestos que tienen anillos benzoicos, también tienen una menor toxicidad y/o excelente selectividad, como es el caso del complejo L4CA con *P. capsici* ⁽¹⁸⁾.

La presencia de un sustituyente de mayor tamaño en los complejos de zinc(II), como es el grupo alquilo frente al hidrógeno, en el nitrógeno del grupo tioamida también parece aumentar la actividad antifúngica ^(13, 19, 20). Este es el caso de los compuestos L3CA y L4CA.

En estudios realizados usando como patógeno *Aspergillus niger* se demostró que complejos de zinc(II) con ligandos cloro adicionales tienen una actividad antifúngica moderada frente a este hongo ⁽¹³⁾. Esto concuerda con que los compuestos L1CB y L2CB ensayados muestren actividad antifúngica en los patógenos estudiados en el presente trabajo.

En función de los resultados anteriores se decidió continuar con los experimentos ensayando con la tiosemicarbazona L4 y el complejo L4CA para ambos patógenos y verificar la eficacia y especificidad de estos compuestos. Para ello se calculó el valor de la ED₅₀.

Los resultados para el porcentaje de inhibición en el caso de *B. cinerea* (Figuras 15 y 16) se han obtenido usando los valores correspondientes a las concentraciones 5, 25 y 125 μM en el caso de ambos compuestos.

En la Figura 15 se compara la media del porcentaje de inhibición a cada concentración de la tiosemicarbazona L4. Se observa que para una concentración de 5 μM no solo no tiene efecto inhibitorio sobre el hongo, sino que, al ser este valor negativo, de alguna manera favorece el crecimiento de *B. cinerea* en placa. Esta misma situación ocurre cuando se ensaya a una concentración de 25 μM, aunque más levemente. En cambio, para una concentración de 125 μM sí que se observa un efecto inhibitorio, pero este alcanza solo el 20% de inhibición. Según estos datos, la ED₅₀ sería mayor que 125 μM.

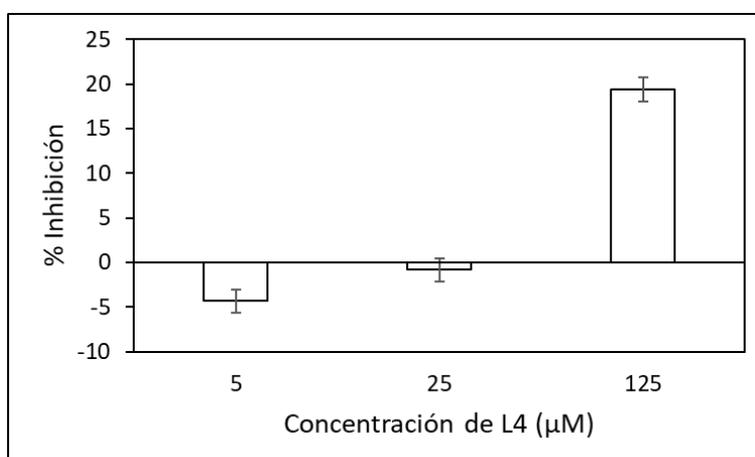


Figura 15. Porcentaje de inhibición en función de la concentración del compuesto L4 para *B. cinerea*. Datos del promedio \pm error estándar ($n = 8$).

En la Figura 16 se compara la media del porcentaje de inhibición a cada concentración del complejo L4CA. Se observa que para una concentración de 5 μM este complejo no tiene efecto inhibitorio e incluso favorece levemente el crecimiento de *B. cinerea* en placa. A 25 μM se produce una ligera inhibición que alcanza el 10%. En cambio, para una concentración de 125 μM sí que se observa un efecto inhibitorio significativo que alcanza el 60% de inhibición.

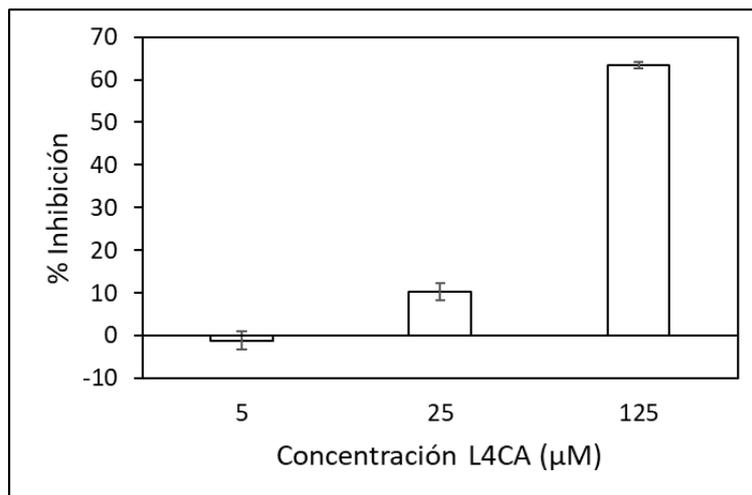


Figura 16. Porcentaje de inhibición en función de la concentración del compuesto L4CA para *B. cinerea*. Datos del promedio \pm error estándar ($n = 8$).

Como sí se obtiene una concentración en la que se supera el 50% de inhibición se puede calcular el valor de la ED_{50} . Éste se calcula mediante una recta de ajuste lineal. La ecuación de la recta resultante da $y = 46,11x - 40,315$ y el coeficiente de correlación da un valor de $R^2 = 0,8546$. Este ajuste lineal da un valor de ED_{50} igual a $90,9\mu\text{M}$.

Sin embargo, este valor de concentración es bastante alto cuando se tiene en cuenta que el compuesto ensayado se utilizaría en un producto fitosanitario, de forma que altas concentraciones del compuesto podrían resultar tóxico para la planta, y, además, su producción podría no ser rentable económicamente.

Los resultados para el grado de inhibición en el caso de *P. capsici* (Figuras 17 y 18) se han obtenido usando los valores correspondientes a las concentraciones 1, 12,5, 25 y $125\mu\text{M}$ en el caso de ambos compuestos.

De nuevo, en la Figura 17 se compara la media del porcentaje de inhibición a cada concentración de la tiosemicarbazona L4. A $1\mu\text{M}$ no tiene efecto inhibitorio, sino que favorece el crecimiento; mientras que para el resto de concentraciones sí hay cierta inhibición del crecimiento. A $12,5\mu\text{M}$ el porcentaje de inhibición está próximo al 10% y a $25\mu\text{M}$ éste está próximo al 20%. A $125\mu\text{M}$ el porcentaje de inhibición alcanza el 45%. La ED_{50} sería ligeramente mayor de $125\mu\text{M}$.

Aunque para ningún valor de concentración ensayado se alcanza el 50% de inhibición, en comparación con los datos obtenidos para *B. cinerea*, la tiosemicarbazona L4 tiene mayor efecto inhibitorio para *P. capsici*.

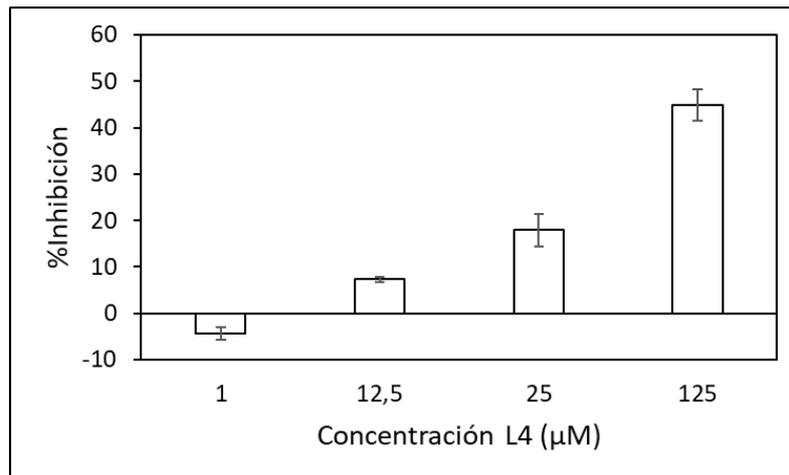


Figura 17. Porcentaje de inhibición en función de la concentración del compuesto L4 para *P. capsici*. Datos del promedio \pm error estándar ($n = 8$).

En la Figura 18 se compara la media del porcentaje de inhibición a cada concentración del complejo L4CA. Se observa que para una concentración de 1 μM este complejo tiene un efecto inhibitorio casi despreciable. A 12.5 μM se alcanza un porcentaje de inhibición del 40%. Para una concentración de 25 μM se alcanza un efecto inhibitorio del 75% y para 125 μM, del 85%.

Comparando estos valores con los obtenidos para *B. cinerea* se observa claramente que el complejo tiene un mayor efecto inhibitorio en *P. capsici*, ya que a las mismas concentraciones el porcentaje de inhibición es superior. Estos resultados podrían indicar que el complejo L4CA es específico para *P. capsici*.

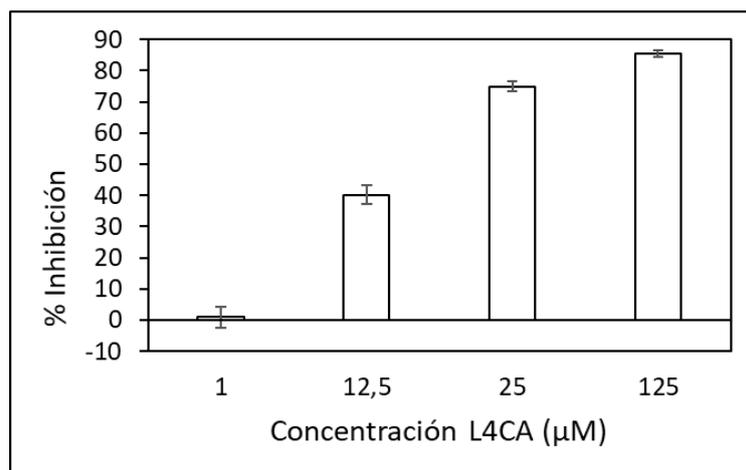


Figura 18. Porcentaje de inhibición en función de la concentración del compuesto L4 para *P. capsici*. Datos del promedio \pm error estándar ($n = 8$).

Al obtener al menos una concentración en la que se supera el 50% de inhibición se puede calcular el valor de la ED₅₀. Éste se calcula mediante una recta de

ajuste lineal. La ecuación de la recta resultante da $y = 42,378x + 1,7407$ y el coeficiente de correlación da un valor de $R^2 = 0,9019$. Este ajuste lineal da un valor de ED_{50} igual a $13,8\mu\text{M}$.

Este valor de concentración es más asequible a la hora de fabricar un producto fitosanitario y también más rentable a nivel económico a la hora de su producción.

En función de estos resultados se observa que, para el mismo compuesto, el L4CA, se precisa menor concentración del mismo para alcanzar el 50% de inhibición del crecimiento de *P. capsici* (aprox. $14\mu\text{M}$) que para alcanzar el mismo porcentaje de inhibición de crecimiento de *B. cinerea* (aprox. $91\mu\text{M}$). De este resultado se deduce que *P. capsici* es más sensible a la acción del L4CA.

Como ya se ha dicho, la actividad se incrementa cuando las tiosemicarbazonas forman complejos con iones metálicos ⁽¹⁷⁾, lo que concuerda con que el complejo L4CA tenga mayor capacidad de inhibición que la tiosemicarbazona L4 de la que deriva. Aun así, el aumento de la actividad biológica del complejo respecto al ligando libre depende de un gran número de factores estructurales, del ion metálico usado, así como del organismo ensayado ^(19, 20, 21).

Los diferentes resultados de los compuestos ensayados frente a los patógenos pueden deberse a las diferencias que existen entre los oomicetos y los hongos verdaderos ⁽²¹⁾. Ensayos con tiosemicarbazonas publicados demuestran que estas no tienen efecto en la síntesis de quitina, que es uno de los compuestos mayoritarios que componen la pared celular de los hongos, pero no la de los oomicetos ⁽²²⁾. Esto puede explicar por qué el complejo ensayado tiene mayor efecto inhibitorio en el oomiceto que en el hongo.

4.2. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN EN PLANTA

Los resultados de los experimentos realizados *in vitro* sirvieron para seleccionar los compuestos y el patógeno a usar en los experimentos de inhibición en planta.

Se seleccionó la tiosemicarbazona L4 y su complejo de zinc(II), L4CA, y el patógeno *P. capsici*, ya que es en éste donde se observan mayores efectos inhibitorios para los compuestos elegidos.

En este experimento se midió el efecto de inhibición de L4 sobre *P. capsici* *in planta*, y lo mismo con L4CA. La media de los datos obtenidos como área de la lesión para cada tratamiento se compararon con la media de los datos obtenidos para un control (*Figura 19* y *Figura 20*).

Los resultados de los test descritos en el apartado 3.4 muestran que sí hay diferencia significativa en los síntomas de *P. capsici* *in planta* para las medias de los distintos tratamientos.

En la *Figura 19* se compara la media del área de la lesión para cada tratamiento a nivel local. Cuando se trata directamente la hoja de la planta con la tiosemicarbazona L4 no se observa un efecto inhibitorio comparado con el tratamiento control, es decir, entre el tratamiento control y el tratamiento L4 no hay diferencias significativas. Sin embargo, cuando se trata la hoja de la planta directamente con el complejo L4CA se observan diferencias significativas con el tratamiento control. También se muestran diferencias significativas entre el tratamiento con L4 y el tratamiento con L4CA.

Por lo tanto, la tiosemicarbazona solo tiene efecto local *in planta* cuando está unida al zinc(II) formando un complejo.

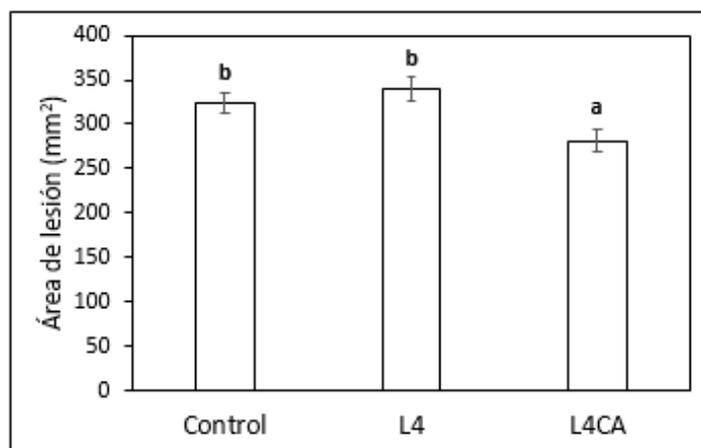


Figura 19. Efecto de L4 y L4CA sobre los síntomas de P. capsici a nivel local. Promedio de las áreas de lesión ± error estándar (n = 32). Letras diferentes indican diferencias significativas en un test de Bonferroni ($\alpha = 0,05$).

En la *Figura 20* se compara la media del área de la lesión para cada tratamiento a nivel sistémico. En este caso las hojas de la planta no han sido tratadas directamente, sino que el efecto inhibitorio que se pueda observar es debido a la activación de defensas en la planta a nivel local y que ha tenido su efecto a nivel

sistémico. En el caso de la tiosemicarbazona L4 no hay diferencias significativas comparado con el tratamiento control. En cambio, sí que se observan diferencias significativas entre el tratamiento control y el tratamiento con L4CA. También se observan diferencias significativas entre el tratamiento con L4 y el tratamiento con L4CA.

Al igual que en el caso anterior, solo la tiosemicarbazona unida al zinc(II) formando un complejo tiene efecto protector a nivel sistémico *in planta*.

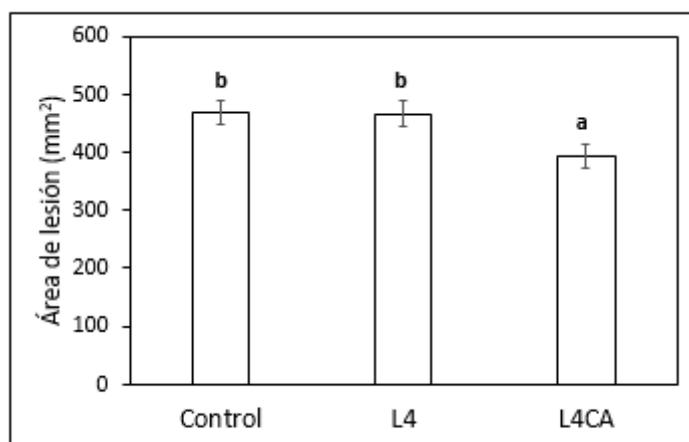


Figura 20. Efecto de L4 y L4CA sobre los síntomas de *P. capsici* a nivel sistémico. Promedio de las áreas de lesión \pm error estándar ($n = 32$). Letras diferentes indican diferencias significativas en un test de Bonferroni ($\alpha = 0,05$).

Las plantas tienen diferentes mecanismos de defensa que pueden iniciarse en respuesta a un estrés biótico como es el ataque de un patógeno ⁽²²⁾. También pueden activarse con la presencia de sustancias químicas análogas a las que presentan los patógenos o a las hormonas vegetales que intervienen en la transducción de señales del mecanismo de defensa ^(23, 24, 25). Según esto y los resultados obtenidos, es probable que el complejo L4CA induzca una respuesta de resistencia inducida en la planta que proteja a la misma ante el ataque del patógeno.

Los mecanismos de defensa asociados a la resistencia inducida se pueden expresar tanto local como sistémicamente ⁽²³⁾. Esto concuerda con que, aun aplicando el complejo en las hojas a nivel local también se produzca un efecto protector frente al patógeno a nivel sistémico.

CONCLUSIONES

En función de los resultados y los objetivos planteados se concluye:

- Algunas tiosemicarbazonas y sus complejos con zinc(II) ensayados son capaces de inhibir el crecimiento de *B. cinerea* y *P. capsici*. El compuesto más efectivo fue el complejo L4CA, siendo además parcialmente selectivo para *P. capsici*.
- El complejo L4CA es efectivo para la protección de la planta de calabacín frente a *P. capsici*, tanto a nivel local como sistémico, lo que sugiere una activación de los mecanismos de defensa de la planta.

CONCLUSIÓNS

En función dos resultados e os obxectivos plantexados conclúese:

- Algunhas tiosemicarbazonas e os seus complexos con zinc(II) ensaiados son capaces de inhibir o crecemento de *B. cinerea* e *P. capsici*. O composto máis efectivo foi o complexo L4CA, sendo ademais parcialmente selectivo para *P. capsici*.
- O complexo L4CA é efectivo para a protección da planta de cabaciña fronte a *P. capsici*, tanto a nivel local coma sistémico, o que suxire unha activación dos mecanismos de defensa da planta.

CONCLUSIONS

Based on the results and objectives, it is concluded:

- Some thiosemicarbazones and their complexes with zinc(II) tested are able to inhibit the growth of *B. cinerea* and *P. capsici*. The most effective compound was the L4CA complex, being also partially selective for *P. capsici*.
- The L4CA complex is effective in protecting the zucchini plant against *P. capsici*, both locally and systemically, suggesting an activation of the plant defense mechanisms.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Oliver, R. P., Beckerman, J. L. (2022) *Fungicides in Practice*. CABI. ISB-13: 9781789246919
- (2) Román, M. C., González, M. C., Córdoba, C. V., Cano, M. I. G., Márquez, C., Castillo, J. R., Díaz, R. M. J., Cruz, L. M. G., Salmerón, J. I. C., Ramirez, F. O., Palma, J. G., Roldán, S. L., Vérez, A. C., Espejo, J. M. R., Rodríguez, J. M., Doncel, J. A., Lope, M. C., Dueñas, Á. F., De Paula Sánchez, F., . . . Camacho, J. M. E. (2017). *Boletín de la Real Academia de Córdoba, de Ciencias, Bellas Letras y Nobles Artes*, N.166 <http://repositorio.racordoba.es:8080/jspui/bitstream/10853/189/3/BRAC%20166.pdf>
- (3) <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (Consultado por última vez 06/09/2023)
- (4) <https://tiendahusquvarna.com/blog/botrytis/#:~:text=La%20Botrytis%2C%20conocida%20com%C3%BAmente%20como,en%20climas%20suaves%20y%20h%C3%BAmedos> (Consultado por última vez 10/07/2023)
- (5) Rupp, S., Weber, R. W., Rieger, D., Detzel, P., & Hahn, M. (2017). Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02075>
- (6) Lopes, U. P., Zambolim, L., Capobianco, N. P., Gracia, N. A. O., & Freitas-Lopes, R. L. (2017). Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides controlling gray mold on strawberry in Brazil. *Bragantia*, 76(2), 266-272. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.05>
- (7) <https://cuccap.org/espanol/infeccion-de-phytophthora/> (Consultado por última vez 14/08/2023)
- (8) <https://www.koppert.mx/retos/control-de-enfermedades/tizon-del-pimiento/> (Consultado por última vez 14/08/2023)

- (9) Granke, L. L., Quesada-Ocampo, L. M., Lamour, K., & Hausbeck, M. K. (2012). Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. *Plant Disease*, 96(11), 1588-1600. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-12-0211-fe>
- (10) Bajaj, K., Buchanan, R. M., & Grapperhaus, C. A. (2021). Antifungal activity of thiosemicarbazones, bis(thiosemicarbazones), and their metal complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 225, 111620. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111620>
- (11) Hu, W., Zhou, W., Xia, C., & Xi, W. (2006). Synthesis and anticancer activity of thiosemicarbazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(8), 2213-2218. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.01.048>
- (12) Kovala-Demertzi, D., Yadav, P., 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(9), 1558-1567. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.05.006>
- (13) 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(2-3), 298-310. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(03\)00156-9](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(03)00156-9)
- (14) De Oliveira, R. B., Souza-Fagundes, E. M., Soares, R. P., De Andrade, A. J. P., Krettli, A. U., & Zani, C. L. (2008). Synthesis and antimalarial activity of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. *European Journal of*

- (15) Jamiolkowska, A., Skwaryło-Bednarz, B., Mielniczuk, E., Bisceglie, F., Pelosi, G., Degola, F., Gałązka, A., & Grzęda, E. (2022). Effect of thiosemicarbazone derivatives and *Fusarium culmorum* (WM.G. SM.) Sacc. infection of winter wheat seedlings on their health status and soil biological activity. *Agronomy*, 12(1), 116. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010116>
- (16) Martín Jiménez, C. (2023). *Síntesis de complejos con potencial actividad fitosanitaria* [Trabajo Fin de Grado en Química, Universidade da Coruña] <http://hdl.handle.net/2183/33314>
- (17) Zani, C., Bisceglie, F., Restivo, F. M., Feretti, D., Pioli, M., Degola, F., Montalbano, S., Galati, S., Pelosi, G., Viola, G. C. V., 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. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.008>
- (18) Guan, A., Liu, C., Sun, X., Xie, Y., & Wang, M. (2016). Discovery of pyridine-based agrochemicals by using intermediate derivatization methods. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(3), 342-353. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.09.031>
- (19) Liberta, A. E., & West, D. X. (1992). Antifungal and antitumor activity of heterocyclic thiosemicarbazones and their metal complexes: current status. *Biomaterials*, 5(2), 121-126. <https://doi.org/10.1007/bf01062223>
- (20) West, D. X., Lockwood, M. A., Liberta, A. E., Chen, X., & Willett, R. D. (1993). Spectral nature, antifungal activity and molecular structure of metal complexes of acetylpyrazine 4N-substituted thiosemicarbazones. *Transition Metal Chemistry*, 18(2), 221-227. <https://doi.org/10.1007/bf00139960>

- (21) 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.009>
- (22) García, T., Veloso, J., & Díaz, J. (2017). Properties of vanillyl nonanoate for protection of pepper plants against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 150(4), 1091-1101. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1352-0>
- (23) Meena, M., Yadav, G., Sonigra, P., Nagda, A., Mehta, T., Swapnil, P., Harish, & Marwal, A. (2022). Role of elicitors to initiate the induction of systemic resistance in plants to biotic stress. *Plant Stress*, 5, 100103. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100103>
- (24) Reglinski, T., Havis, N. D., Rees, H., & De Jong, H. (2023). The practical role of induced resistance for crop protection. *Phytopathology*, 113(4), 719-731. <https://doi.org/10.1094/phyto-10-22-0400-ia>
- (25) Salman, E. K., Ghoniem, K. E., Badr, E. S., & Aboulila, A. A. (2022). Identification of chlorpromazine hydrochloride role as a new systemic acquired resistance inducer against *Magnaporthe oryzae* in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117, 101770. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101770>