

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**Estudios *In vitro* de nuevas formulaciones basadas en 3
tienil 5 azido pirazol para el control de hongos fitopatógenos**

Tesis

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Presenta

STEPHANIA OLIVARES SANCHEZ

**Bajo la supervisión de: DR. JAIME ALFREDO URZUA
GUTIERREZ**

**CO-DIRECTOR: JAIME DANIEL CANSECO
GONZALEZ**



APROBADA



Chapingo, Estado de México Junio 2026

**ESTUDIOS IN VITRO DE NUEVAS FORMULACIONES BASADAS EN 3
TIENIL 5 AZIDO PIRAZOL PARA EL CONTROL DE HONGOS
FITOPATOGENOS**

Tesis realizada por Stephania Olivares Sánchez bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL

DIRECTOR: 
DR. JAIME ALFREDO URZUA GUTIERREZ

CODIRECTOR: 
DR. JAIME DANIEL CANSECO GONZALEZ

ASESOR: 
DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

ASESOR: 
DR. OMAR ALEJANDRO GUIRETTE BARBOSA

DEDICATORIA

A mis padres

Esta tesis está dedicada con profundo cariño y gratitud a mis padres, Raul Olivares Fernández y Ma. Estela Sánchez Ruiz por su apoyo incondicional ha sido fundamental en cada paso de mi vida académica y personal. Gracias por su comprensión, por su amor siempre presente y por confiar en mis decisiones. Estar siempre para mí ha significado todo, y esta dedicación es un pequeño reconocimiento a todo lo que han hecho por mí.

A mi hermana

También dedico este trabajo a mi hermana, Karen Edith Olivares Sánchez. Ha sido mi guía, mi apoyo constante y, sobre todo, mi inspiración. Su presencia me ha motivado a seguir adelante y a esforzarme para alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS

A la secretaria de Ciencias Humanidades, Humanidades, Tecnología e Innovación por la beca otorgada.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** en especial al programa de la maestría **en Ciencias en Protección Vegetal** por la oportunidad de realizar la maestría en esta institución y a Maribel por el apoyo y el cariño que brindo en ese tiempo.

A mis amigas **Manuela Morales Hernández** y **Cynthia García Tavares** por apoyo comprensión y por siempre estar para mí.

A mi compañeros y amigos de maestría **Lucia y Natan** pero en especial a **Ruben y Paulina** por el apoyo y el conocimiento brindado durante estos dos años por hacer mi estancia mas bonita.

A mi comité asesor al **Dr. Jaime Alfredo Urzua Gutiérrez**, al **Dr. Jaime Daniel Canseco González**, al **Dr. Marcelo Acosta Ramos** y al **Dr. Omar Alejandro Guirette Barboza Rodríguez** por el apoyo para poder realizar este proyecto.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Stephania Olivares Sánchez

Fecha de nacimiento: 13 de marzo de 1996

Lugar de nacimiento: Fresnillo, Zacatecas

Profesión: Ingeniera Biotecnóloga

Cédula profesional: 11306022

Formación académica profesional

Comenzó sus estudios profesionales en la Universidad Politécnica de Zacatecas generación 2014 - 2017 en la carrera de Ingeniería en Biotecnología obteniendo el título de Ingeniero Biotecnólogo y en el 2024 ingreso a la Universidad Autónoma Chapingo a la maestría en Ciencias en Protección Vegetal.

Tabla de contenido

Índice de cuadros.....	x
Índice de Figuras.....	xi
Resumen general	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1 Justificación.....	3
1.2 Objetivo general.....	5
1.2.1 Objetivos específicos	5
1.3 Hipótesis.....	5
Literatura citada	6
CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2 generalidades del pirazol	8
2.1 Estructura y características del núcleo pirazol.....	8
2.1.1 Desarrollo de nuevos derivados de pirazol.....	8
2.1.2 Importancia biológica	8
2.1.3 Importancia de los fitopatógenos en la agricultura.....	9
2.2. Hongos fitopatógenos de estudio	10
2.2.1 <i>Sclerotium cepivorum</i>	10
2.2.2 Taxonomía.....	10
2.2.3 Síntomas	11
2.2.3 Ecología y epidemiología de <i>Sclerotium cepivorum</i>	11
2.2.4 Métodos de control.....	12
2.3 <i>Botrytis cinérea</i>.	12
2.3.1 Taxonomía.....	13
2.3.2 Síntomas	14
2.3.3 Ecología y epidemiología de <i>Botrytis spp</i>	14
2.3.4 Métodos de control.....	14
2.4 <i>Neopestalotipsis spp</i>	16
2.4.1 Taxonomía.....	16
2.4.2 Síntomas	17
2.4.3 Ecología y epidemiologia de <i>Neopestalotiopsis</i>	17

2.4.4 Métodos de control.....	18
2.5 <i>Fusarium oxysporum</i>	20
2.5.1 Taxonomía.....	20
2.5.2 Ecología y epidemiología de <i>Fusarium oxysporum</i>	21
2.5.4 Métodos de control.....	21
CAPITULO 3 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DE 3 TIENIL 5 AZIDO PIRAZOL SOLA Y EN COMBINACION CON NANOPARTICULAS DE PLATA Y TEBUCONAZOL CONTRA <i>Sclerotium cepivorum</i>.....	32
3.1. Introducción	33
3. Materiales y métodos	34
3.1 Síntesis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol	34
3.1.1 Preparación de los tratamientos	35
3.2 Análisis <i>In vitro</i>	35
3.2.1 Análisis <i>In vitro</i> de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra <i>Sclerotium cepivorum</i> ..	35
3.2.2 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con tebuconazol contra <i>Sclerotium cepivorum</i>	37
3.2.3 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con Nanopartículas de plata contra <i>Sclerotium cepivorum</i>	38
3.3 Análisis <i>In situ</i>	39
3.3.1 Establecimiento del protocolo experimental.....	39
3.3.1 Inoculación del patógeno.....	39
3.4.1 Aplicación del tratamiento	40
3.4.2 Evaluación de incidencia.....	40
3.4.3 Análisis estadístico	40
3.5. Resultados.....	41
3.5.1 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra <i>Sclerotium cepivorum</i>	41
3.5.2 Gráficos representativos	44
3.6 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con tebuconazol contra <i>Sclerotium cepivorum</i>	46
3.6.1 Gráficos representativos	48
3.7 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con Nanopartículas de plata contra <i>Sclerotium cepivorum</i>	50
3.8 Análisis de la aplicación de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol a nivel invernadero	53
3.9. Discusión	55
3.10 Conclusión.....	57

Literatura citada	57
CAPITULO 4 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DE 3 TIENIL 5 AZIDO PIRAZOL SOLA Y EN COMBINACION CON NANOPATILUAS DE PLATA Y TEBUCONAZOL CONTRA <i>Botrytis spp</i>	59
4.1 Introducción.....	59
4.2. Materiales y métodos	60
4.3 Resultados	61
4.3.1 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra <i>Botrytis spp</i>	61
4.3.2 Gráficos representativos	63
.....	64
4.4 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Tebuconazol contra <i>Botrytis spp</i>	65
4.4.1 Gráficos representativos	67
4.5 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Nanopartículas de plata contra <i>Botrytis spp</i>	71
4.5.1 Gráficos representativos	73
4.6 Discusión	75
4.7 Conclusión.....	76
Literatura citada	77
CAPITULO 5 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DE 3 TIENIL 5 AZIDO PIRAZOL SOLA Y EN COMBINACION CON NANOPATILUAS DE PLATA Y TEBUCONAZOL CONTRA <i>Fusarium sp</i>	79
5.1 Introducción.....	79
5.2 Materiales y métodos	81
5.3. Resultados	81
5.3.1 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra <i>Fusarium spp</i>	81
5.3.2 Gráficos representativos	83
5.4 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Tebuconazol contra <i>Fusarium spp</i> ..	87
5.4.1 Gráficos representativos	89
5.5 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Nanopartículas de plata contra <i>Fusarium spp</i>	92
5.5.1 Gráficos representativos	94
5.6 Discusión	97
5.7 Conclusión	98
Literatura citada	99

CAPITULO 6 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DE 3 TIENIL 5 AZIDO PIRAZOL SOLA Y EN COMBINACIÓN CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y TEBUCONAZOL CONTRA <i>Neopestalotiopsis spp</i>	102
6.1 Introducción	102
6.2 Materiales y métodos.....	103
6.3 Resultados.....	104
6.3.1 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra <i>Neopestalotiopsis spp</i>	104
6.3.2 Gráficos representativos	106
6.4 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Tebuconazol contra <i>Neopestalotiopsis spp</i>	109
6.4.1 Gráficos representativos	111
6.5 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Nanopartículas de plata contra <i>Neopestalotiopsis spp</i>	114
6.5.1 Gráficos representativos	116
6.6 Discusión	119
6.7 Conclusión	120
Literatura citada	121

Índice de cuadros

Cuadro 1. Concentraciones y tratamientos de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol sola.	36
Cuadro 2. Concentraciones y tratamientos de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con tebuconazol.	37
Cuadro 3 Concentraciones y tratamientos de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con Nanopartículas de plata.....	38
Cuadro 4. Porcentajes de inhibición con tres repeticiones	42
Cuadro 5:Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración de la molécula3 tienil 5 azido pirazol.....	44
Cuadro 6: Efecto antifúngico de la combinación de 3-tienil-5-azido pirazol y tebuconazol sobre el crecimiento micelial de Sclerotium cepivorum en condiciones <i>In vitro</i>	47
Cuadro 7: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración	48
Cuadro 8: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración	61
Cuadro 9: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración	62
Cuadro 10: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis spp.</i> por efecto de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol en combinación con tebuconazol bajo condiciones <i>In vitro</i>	65
Cuadro 11: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración	67
Cuadro 12 Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de Botrytis spp. por efecto de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol en combinación con nanopartículas de plata bajo condiciones <i>In vitro</i>	71
Cuadro 13: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración	72
Cuadro 14: Efecto antifúngico de la combinación de 3-tienil-5-azido pirazol sobre el crecimiento micelial de Fusarium spp en condiciones <i>In vitro</i>	82
Cuadro 15: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración	83
Cuadro 16: Concentraciones y porcentajes de inhibición de la molécula sola	87
1Figura 17: Crecimiento micelial de Fusarium spp en cajas petri.....	88
1Cuadro 18:Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración	88
Cuadro 19 Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de Fusarium spp. por efecto de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol en combinación con nanopartículas de plata bajo condiciones <i>In vitro</i> .:.....	92
Cuadro 20: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración	93
Cuadro 21: Concentraciones en ppm de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con tres repeticiones	104
Cuadro 22: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración	105
Cuadro 23: Concentraciones en ppm de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con tres repeticiones	109
Cuadro 24: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración	110

Cuadro 25: Concentraciones en ppm de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con tres repeticiones	114
Cuadro 26: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración.....	115

Índice de Figuras

Figura 1: Crecimiento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> en cajas Petri bajo diferentes concentraciones del tratamiento de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol	43
Figura 2: Análisis de la concentración mínima inhibitoria al 50%	43
Figura 3. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración	45
Figura 4. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol	45
Figura 5: Crecimiento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> en cajas Petri.....	47
Figura 6. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración	49
Figura 7. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración del tratamiento.....	49
Cuadro 8: Efecto antifúngico de la combinación de 3-tienil-5-azido pirazol y Nanopartículas de plata sobre el crecimiento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> en condiciones <i>In vitro</i>	51
Figura 9 : Crecimiento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> en cajas Petri con nanopartículas de plata.....	52
Figura 10: Análisis de la concentración mínima inhibitoria al 50% con un resultado de (molécula 3 tienil 5 azido pirazol más nanopartículas de plata).....	53
Figura 11: plantas representativas de las 3 dosis aplicadas donde A: testigo negativo B: 600 ppm de la molécula C: 60 ppm, D: 6 ppm y E: testigo positivo	55
Figura 12: Crecimiento micelial de <i>Botrytis sp</i> , en cajas Petri bajo diferentes concentraciones del tratamiento de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol.....	62
Figura 13. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración.de <i>Botrytis spp</i>	63
Figura 14. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración.	64
Figura 15. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica, con estimación de IC ₅₀	64
Figura 16: Crecimiento micelial de <i>Botrytis spp</i> en cajas Petri, 3 tienil 5 azido pirazol y t=tebuconazol.	66
Figura 17. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración	68
Figura 18. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración.	69
Figura 19. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica y estimación de IC ₅₀ (7.71 ppm).	70
Figura 20 : Crecimiento micelial de <i>Botrytis spp</i> en cajas Petri, 3 tienil 5 azido pirazol con Nanopartículas de plata.	72
Figura 21. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración	73
Figura 22: Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración.	74
Figura 23: Curva dosis–respuesta en escala logarítmica y estimación de IC ₅₀	75
Figura 24: Crecimiento micelial de <i>Fusarium spp</i> en cajas Petri.....	82
Figura 25. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración (Molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra <i>Fusarium spp</i>).....	84
Figura 26. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración. (Molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra <i>Fusarium spp</i>).....	85

Figura 27. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica y estimación de IC ₅₀ , (Molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra <i>Fusarium spp</i>).	86
Figura 28. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración (<i>Fusarium spp</i> contra molécula 3 tienil 5 azido pirazol junto con tebconazole)	89
Figura 29. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración. (<i>Fusarium spp</i> contra molécula 3 tienil 5 azido pirazol junto con tebconazole),	90
Figura 30. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica y estimación de IC ₅₀ (<i>Fusarium spp</i> contra molécula 3 tienil 5 azido pirazol junto con tebconazole),	91
Figura 31. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración (<i>Fusarium spp</i> contra molécula 3 tienil 5 azido pirazol junto con tebconazole)	94
Figura 32. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración. (<i>Fusarium spp</i> contra molécula 3 tienil 5 azido pirazol junto con tebconazole)	95
Figura 33. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica y estimación de IC ₅₀ (<i>Fusarium spp</i> contra molécula 3 tienil 5 azido pirazol junto con tebconazole)	96
Figura 34: Crecimiento micelial de <i>Fusarium spp</i> en cajas Petri bajo diferentes concentraciones del tratamiento de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol,	105
Figura 35. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración	106
Figura 36. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración. ..	107
Figura 37. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica y estimación de IC ₅₀	108
Figura 38: Crecimiento micelial de <i>Fusarium spp</i> en cajas Petri	110
Figura 39. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración	111
Figura 40. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración. ..	112
Figura 41. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica y estimación de EC ₅₀	113
Figura 42: Crecimiento micelial de <i>Neopestalotiopsis spp</i> en cajas Petri 3 tienil 5 azido pirazol y Ag = Nanopartículas de plata	115
Figura 42. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración	116
Figura 44. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración. ..	117
Figura 45. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica y estimación de IC ₅₀	118

Estudios *In vitro* de nuevas formulaciones basadas en 3 tienil 5 azido pirazol para el control de hongos fitopatógenos.

Resumen general

En el presente estudio se evaluó la actividad antifúngica *In vitro* de nuevas formulaciones basadas en 3-tienil-5-azido pirazol contra cuatro hongos fitopatógenos de importancia agrícola: *Sclerotium cepivorum*, *Botrytis spp*, *Fusarium spp*, y *Neopestalotiopsis spp*, La molécula fue evaluada de manera individual y en combinación con tebuconazol y nanopartículas de plata a diferentes concentraciones, con el objetivo de determinar su efecto sobre la inhibición del crecimiento micelial.

Los resultados mostraron un efecto antifúngico dependiente de la concentración en todos los patógenos evaluados, alcanzando niveles de inhibición cercanos al 100% en concentraciones altas. En *Sclerotium cepivorum*, la molécula sola presentó un IC₅₀ de 5.23 ppm y la combinación con nanopartículas de plata un IC₅₀ de 5.63 ppm. En *Botrytis spp*, la molécula sola presentó un IC₅₀ de 10.46 ppm y la combinación con tebuconazol un EC₅₀ de 6.95 ppm, y la combinación con nanopartículas de plata presentó un IC₅₀ de 6.95 ppm. En *Fusarium spp*, la molécula sola presentó un IC₅₀ de 17.49 ppm, la combinación con tebuconazol un IC₅₀ de 8.70 ppm y la combinación con nanopartículas de plata un IC₅₀ de 17.37 ppm. Finalmente, en *Neopestalotiopsis spp*, la molécula sola presentó un IC₅₀ de 17.49 ppm, la combinación con tebuconazol un IC₅₀ de 9.06 ppm y la combinación con nanopartículas de plata un IC₅₀ de 13.77 ppm. Adicionalmente, los ensayos *In situ* realizados contra *Sclerotium cepivorum* confirmaron la eficacia biológica del compuesto a 600 ppm obtuvo un control del 92 % mientras que a 60 ppm el control fue de 66 %. En conjunto, los resultados demuestran que la molécula 3-tienil-5-azido pirazol presenta potencial como agente antifúngico de amplio espectro.

Palabras clave

Nanoparticulas de Ag, Tebuconazol, concentración inhibitoria, azido aril pirazol

***In Vitro* Studies of New Formulations Based on 3-Thienyl-5-Azidopyrazole for the Control of Phytopathogenic Fungi**

Abstract

This study evaluated the *In vitro* antifungal activity of new formulations based on 3-thienyl-5-azido pyrazole against four plant-pathogenic fungi of agricultural importance: *Sclerotium cepivorum*, *Botrytis* spp., *Fusarium* spp., and *Neopestalotiopsis* spp. The molecule was evaluated individually and in combination with tebuconazole and silver nanoparticles at different concentrations, with the aim of determining its effect on the inhibition of mycelial growth. The results showed a concentration-dependent antifungal effect against all evaluated pathogens, reaching inhibition levels close to 100% at high concentrations. Against *Sclerotium cepivorum*, the molecule alone exhibited an IC_{50} of 5.23 ppm, and the combination with silver nanoparticles an IC_{50} of 5.63 ppm. In *Botrytis* spp., the molecule alone exhibited an IC_{50} of 10.46 ppm, and the combination with tebuconazole exhibited an IC_{50} of 6.95 ppm, while the combination with silver nanoparticles exhibited an IC_{50} of 6.95 ppm. In *Fusarium* spp., the molecule alone exhibited an IC_{50} of 17.49 ppm, the combination with tebuconazole an IC_{50} of 8.70 ppm, and the combination with silver nanoparticles an IC_{50} of 17.37 ppm. Finally, in *Neopestalotiopsis* spp., the molecule alone exhibited an IC_{50} of 17.49 ppm, the combination with tebuconazole an IC_{50} of 9.06 ppm, and the combination with silver nanoparticles an IC_{50} of 13.77 ppm. Additionally, field trials conducted against *Sclerotium cepivorum* confirmed the compound's biological efficacy: at 600 ppm, a 92% disease control rate was recorded, while at 60 ppm, the disease control rate was 66%. Overall, the results demonstrate that the 3-thienyl-5-azido pyrazole molecule shows potential as a broad-spectrum antifungal agent.

Keywords

Ag nanoparticles, tebuconazole, inhibitory concentration, aryl azido pyrazole.

Master's Thesis in Plant Protection Sciences, Departament of Agricultural Parasitology, Universidad Autonoma Chapingo
Author: Stephania Olivares Sánchez
Thesis Director: Jaime Alfredo Urzua Gutiérrez

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los pirazoles son compuestos heterocíclicos de cinco miembros que contienen dos átomos de nitrógeno adyacentes. La adición de diversos grupos funcionales hace una estructura más compleja, estos compuestos exhiben propiedades sintéticas, biológicas y fotofísicas de importancia crítica (Badawey, et al 1988, S. Sugiura, et al 1977).

Desde el punto de vista agroquímico, el anillo de pirazol es de gran importancia, debido a que los derivados de pirazoles han sido objeto de atención en el estudio de los fungicidas, debido a su baja toxicidad y alta biactividad (Rainer y Christoph 1995, Itaru et al. 1988). es decir, se ha señalado la importancia de estos derivados en la química de los plaguicidas, ya que tienen actividad herbicida (Ohno, et al 2004), fungicida (Lv, H.S et al 2013) e insecticida (Zhou, et al 2013) consolidándose el anillo de pirazol como un farmacóforo notablemente efectivo en el diseño de fungicidas (Xue-Ru Liu et al 2014).

En la actualidad, se han comercializado numerosos derivados de pirazol como fungicidas; por ejemplo, furametpyr y penthiopyrad. Furametpyr se ha empleado para controlar la roya de vaina del arroz en el campo agrícola, ya que inhibe la síntesis de aspirato y glutamato (F. Dong, et al 2013). Por su parte, penthiopyrad muestra actividad contra enfermedades resistentes tanto a estrobilurinas como a DMI, las cuales son causadas por oídio, moho gris, roya y *Botrytis* (C.B Vicentini, et al 2007).

La efectividad de estos compuestos en la protección de cultivos es especialmente crítica si se consideran las enfermedades fúngicas que afectan la agricultura a nivel mundial, ya que estas reducen tanto la calidad como la cantidad de los productos cosechados.

1.1 Justificación

Las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos continúan representando una de las principales limitantes para la producción agrícola mundial. Géneros como *Sclerotium cepivorum*, agente causal de la pudrición blanca en aliáceas (Zapata et al 2022), *Fusarium spp*, responsables de marchiteces vasculares y pudriciones radicales, y *Botrytis spp*, causantes de mohos grises en diversos cultivos hortícolas y frutales,

generan pérdidas económicas significativas y afectan la calidad comercial de los productos agrícolas (Dean, R. et al 2014).

El manejo convencional de estas enfermedades (*Sclerotium cepivorum*, *Fusarium spp*, *Botrytis spp*, y *Nepestalotipsis spp*) depende en gran medida del uso de fungicidas sintéticos. Sin embargo, el uso continuo y repetitivo de moléculas con el mismo modo de acción ha favorecido la aparición de poblaciones resistentes, particularmente en *Botrytis cinerea* y especies de *Fusarium* (Hahn, 2014; Lucas et al., 2015). Además, las restricciones regulatorias y la creciente preocupación ambiental exigen el desarrollo de compuestos con mayor especificidad, menor toxicidad y nuevos mecanismos de acción.

En este contexto, los compuestos heterocíclicos, especialmente los derivados del núcleo pirazol, han demostrado un amplio espectro de actividad biológica en agroquímica. Diversos fungicidas comerciales inhibidores del succinato deshidrogenasa (SDHI) contienen estructuras relacionadas con pirazoles, lo que evidencia el potencial de este núcleo químico en el control de fitopatógenos (Sierotzki & Scalliet, 2013).

Por otra parte, el grupo funcional azido ($-N_3$) ha despertado interés en química medicinal y química agrícola debido a su alta reactividad y capacidad para modificar propiedades electrónicas y lipofílicas de las moléculas (Bräse et al., 2005). La incorporación del grupo azido en sistemas aril-pirazol podría generar nuevas formulaciones con actividad antifúngica mejorada, ya sea mediante alteraciones en la permeabilidad celular, interferencia metabólica o generación de estrés oxidativo.

A pesar del potencial químico de estos sistemas, existe limitada información sobre la actividad antifúngica *In vitro* de derivados azido aril-pirazol contra patógenos agrícolas de alta importancia económica. Por lo tanto, la presente investigación se justifica en la necesidad de evaluar nuevas formulaciones con posible actividad fungicida, que contribuyan al desarrollo de alternativas innovadoras para el manejo de enfermedades, y que eventualmente puedan reducir la presión de selección y retrasar la aparición de resistencia.

1.2 Objetivo general

- Evaluar la actividad fungistática *In vitro* de nuevas formulaciones basadas en azido aril-pirazol contra *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium spp*, *Botrytis spp*, y *Neopestalotiopsis spp* mediante la determinación de la inhibición del crecimiento micelial y el análisis comparativo de su eficacia biológica.

1.2.1 Objetivos específicos

- Evaluar la concentración mínima inhibitoria al 50 % de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra los hongos *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium spp*, *Botrytis spp* y *Neopestalotiopsis spp*
- Evaluar la concentración mínima inhibitoria al 50 en combinación con nanopartículas de plata a bajas concentraciones (no mayor al 1%) en sinergia con la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra los hongos *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium spp*, *Botrytis spp*, y *Neopestalotiopsis spp*
- Evaluar la concentración mínima inhibitoria al 50 en combinación con Tebuconazol a bajas concentraciones (no mayor al 1%) en sinergia con la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra los hongos *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium spp*, *Botrytis spp* y *Neopestalotiopsis spp*
- Determinar el efecto antifúngico de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol sobre *Sclerotium cepivorum*. en condiciones de invernadero

1.3 Hipótesis

Ha: La molécula 3 tienil 5 azido pirazol a sola o en combinación con tebuconazol o nanopartículas de plata a bajas concentraciones tiene un efecto inhibitorio micelial significativo en los cuatro hongos evaluados comparados con el tratamiento control.

Ho: La molécula 3 tienil 5 azido pirazol a sola o en combinación con tebuconazol o nanopartículas de plata a bajas concentraciones no tiene un efecto inhibitorio micelial significativo en los cuatro hongos evaluados comparados con el tratamiento control.

Literatura citada

- C.B Vicentini, C. Romagnoli, E. Andreotti, Synthetic pyrazole derivatives as growth inhibitors of some phytopathogenic fungi, *J. Agric. Food. Chem.* 55 (2007) 10331–10338
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012).
The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- E.S.A.M. Badawey, I.M. El-Ashmawey, Nonsteroidal anti-inflammatory agents-Part 1: Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of some new 1-(pyrimidin-2-yl)-3-pyrazolin-5-ones and 2-(pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5,6,7-hexahydro-3H- indazol-3-ones, *Eur. J. Med. Chem.* 33 (1998) 349–361.
- Elad, Y., Pertot, I., Prado, A. M. C., & Stewart, A. (2016). Plant hosts of *Botrytis* spp. En S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 413–486). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Hahn, M. (2014).
The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*, 7(4), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The evolution of fungicide resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 90, 29–92. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>
- Lv, H.S.; Wang, L.Y.; Ding, X.L.; Wang, X.H.; Zhao, B.X.; Zuo, H. Synthesis and antifungal activity of novel (1-arylmethyl-3-aryl-1Hpyrazol-5-yl)(4-arylpiperazin-1-yl)methanone derivatives. *J. Chem. Res.* 2013, 37, 473–475.
- Ohno, R.; Watanabe, A.; Matsukawa, T.; Ueda, T.; Sakurai, H.; Hori, M.; Hirai, K. Synthesis and herbicidal activity of new pyrazole-4-carboxamide derivatives. *J. Pestic. Sci.* 2004, 29, 15–26. *Molecules* 2015, 20 4394
- Rainer F, Christoph E (1995) Eur. Patent NO. 679644 A1

- S. Sugiura, S. Ohno, O. Ohtani, Syntheses and anti-inflammatory and hypnotic activity of 5-alkoxy-3-(N-substituted carbamoyl)-1-phenylpyrazoles, *J. Med. Chem.* 20 (1977) 80–85.
- Sierotzki, H., & Scalliet, G. (2013). A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*, 103(9), 880–887. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-13-0059-RVW>
- Zapata-Narváez, Y. A., & Gómez-Marroquín, M. R. (2022). Control de *Sclerotium cepivorum* y promoción del crecimiento en ajo (*Allium sativum*) con microorganismos antagonistas. *Agronomía Mesoamericana*, 33(2).
- Ze-Yu He, Zhi-Qing Ma, Jun-Tao Feng * and Xing Zhang, Design, Synthesis and Fungicidal Activities of Some Novel Pyrazole Derivatives *Molecules* 2014, 19, 14036-14051; doi:10.3390/molecules190914036
- Zhou, Y.Y.; Li, Y.X.; Li, Y.M.; Yang, X.P.; Mao, M.Z.; Li, Z.M. Design, synthesis and structure-activity of N-glycosyl-1-pyridyl-1H-pyrazole-5-carboxamide as Inhibitors of Calcium channels. *Chem. Res. Chin. Univ.* 2013, 29, 249–255.

CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

2 generalidades del pirazol

2.1 Estructura y características del núcleo pirazol

El pirazol es un compuesto heterocíclico aromático de cinco miembros que contiene dos átomos de nitrógeno adyacentes, uno de carácter tipo pirrol (donador de protones) y otro tipo piridina (aceptor de protones), lo que le confiere propiedades ácido-base y una notable versatilidad química (Rostami, H et al 2022, Fustero, S. el al 2009, Wang, Y et al 2020, Regan, A.C. el al 2008)

La observación de que los pirazoles son muy raros en la naturaleza se atribuyó a la presencia de un único enlace (-N-N-) en su estructura, un motivo químico que se cree resulta de muy difícil formación por parte de los organismos vivos (Kumar, V et al 2013).

Como indica su fórmula molecular, el pirazol es una estructura anular de cinco miembros compuesta por tres átomos de carbono y dos átomos de nitrógeno adyacentes. La palabra “pirazol” fue acuñada por primera vez por Ludwig Knorr en 1883. Art 18

2.1.1 Desarrollo de nuevos derivados de pirazol

El desarrollo de nuevos derivados de pirazol se ha enfocado en la incorporación de grupos funcionales que incrementen su actividad biológica. Una de ellas son los grupos azido ($-N_3$) debido que han surgido como un motivo estructural importante en los compuestos energéticos, debido a su alta eficiencia iniciadora. Además, estudios previos indican que el fragmento nitro/azido se considera una combinación prometedora (T.M. Klapötke 2017)

2.1.2 Importancia biológica

Los pirazoles son una de las clases más antiguas de compuestos bioactivos y han sido ampliamente utilizados. La importancia clínica de esta clase ha impulsado la síntesis de nuevos compuestos líderes que retienen el cromóforo básico del pirazol.

El pirazol es un anillo heterocíclico de cinco miembros que contiene dos átomos de nitrógeno adyacentes y es un motivo frecuentemente presente tanto en productos

farmacéuticos como en agroquímicos (Küçükgül y Şenkardeş, 2015; Khan et al., 2016). Los derivados del pirazol muestran una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo efectos antiinflamatorios (Bekhit y Abdel-Aziem, 2004), anticancerígenos (Ma et al., 2013) y analgésicos (Penning et al., 1997), además de actividad antifúngica.

Actualmente, muchos derivados de pirazol se comercializan como fungicidas, ya que el anillo de pirazol es un farmacóforo eficaz para su diseño. Ejemplos recientes incluyen bixafen, fluxapyroxad, penflufen, penthiopyrad, sedaxane, furamethpyr e isopyrazam, todos inhibidores de la succinato deshidrogenasa con estructuras basadas en pirazol (Wu, H 2011). Los derivados sustituidos de pirazol destacan por sus propiedades biológicas, mostrando actividades antimicrobianas (Chen, H et al 2000), herbicidas (Meaza, G et al 2004), antitumorales (Park, H et al 2005), insecticidas (Finkelstein, B.L et al 1997) y fungicidas (Li, M. et al 2010)

2.1.3 Importancia de los fitopatógenos en la agricultura

Las enfermedades de las plantas resultan en una pérdida anual estimada del 10-15% de los principales cultivos del mundo, con pérdidas económicas directas de hasta cientos de miles de millones de dólares (Chatterjee et al., 2016). De estas enfermedades, el 70-80% son causadas por hongos patógenos. Los hongos fitopatógenos tienen efectos adversos en el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Li et al., 2017). Algunas enfermedades no son causadas por un solo patógeno, sino que son el resultado de la sinergia de múltiples patógenos (Chatterjee et al., 2016). En la larga historia evolutiva de las plantas y los hongos patógenos, se han formado relaciones altamente especializadas y extremadamente complejas, creando un patrón de selección mutua y co-evolución. Por lo tanto, con la continua aparición de nuevas variedades y variaciones de hongos patógenos, sus relaciones con las plantas también han cambiado (QuintanilhaPeixoto et al., 2019).

2.2. Hongos fitopatógenos de estudio

2.2.1 *Sclerotium cepivorum*

Sclerotium cepivorum (pudrición blanca) es la principal limitante fitosanitaria del género *Allium*, debido a que el hongo afecta cualquier estado de desarrollo de la planta, produce esclerocios, estructuras de resistencia que le permite sobrevivir en el suelo por más de veinte años y que se diseminan por el agua, herramientas o equipos, y los fungicidas utilizados para el control de la enfermedad solo son efectivos en su estado vegetativo (Amin et al., 2014; Lourenço et al., 2018; Velásquez Valle et al., 2012).

Se utilizan fungicidas como Benomil, Carbendazim, Iprodion y Tebuconazol (Pinzón et al., 2012; Velásquez-Valle & Reveles-Hernández, 2016), que pueden presentar una vida media de hasta cinco semanas en el suelo y pueden causar efectos negativos sobre diferentes poblaciones de hongos, en particular en aquellos que inician los procesos de descomposición de la materia orgánica, así como en hongos formadores de micorrizas (Cycoñ et al., 2006; O'Connor et al., 2009; Tejada et al., 2011).

2.2.2 Taxonomía

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo (División): Ascomycota

Clase: Leotiomycetes

Orden: Helotiales

Familia: Sclerotiniaceae

Género: *Stromatina*

Especie: *Stromatina cepivora* (*Sclerotium cepivorum* Berk)

2024)

2.2.3 Síntomas

Esta enfermedad ataca el cultivo en todas las etapas de crecimiento, las hojas de las plantas parcialmente y completamente desarrolladas se vuelven amarillas y se marchitan. También hay micelios blancos en la superficie de los bulbos o en la corona de las plántulas. El esclerocio pequeño es de forma redondeada y también desarrolla micelio. El sistema de raíces de los cultivos se destruye por completo y las hojas de los cultivos también se vuelven amarillas y se marchitan, las plantas se caen a medida que las raíces se pudren, al levantar la planta afectadas se pueden ver un crecimiento fúngico blanco y esponjoso alrededor del bulbo con pequeños puntos negros, esos puntos negros son cuerpos en reposo de los esclerocios (Mohammed et al 2014).

2.2.3 Ecología y epidemiología de *Sclerotium cepivorum*

Los esclerocios que se forman en el huésped en descomposición permanecen inactivos hasta que los exudados de la raíz de una planta huésped estimulen la germinación específicamente los exudados de la raíz. Los niveles de humedad del suelo óptimos para el crecimiento de las raíces del huésped también lo son para la germinación de los esclerocios. El micelio crece a través del suelo y una vez que se encuentra dentro de la raíz huésped el hongo formara apresorios, estructuras cuyo propósito es ayudar en la fijación y penetración del huésped. El micelio puede crecer hacia afuera desde las raíces de una planta hasta las raíces de una planta vecina, y es por este método que el patógeno puede moverse. Los esclerocios se forman en el tejido huésped en descomposición u una vez que el tejido huésped se descomponer por completo los esclerocios quedan libres en el suelo. Si los bulbos sobreviven el tiempo suficiente para

ser colocados en el almacenamiento, el patógeno puede continuar descomponiendo los bulbos si hay alta humedad y bajas temperaturas, Si los bulbos se almacenan secos entonces la enfermedad puede no propagarse.

Los esclerocios se producen en abundancia en el tejido vegetal infectado y tiene de 200 a 500 μm de diámetro (Maude et al 2006), Los esclerocios dependen de volátiles para germinar, las condiciones ambientales también influyen en la germinación, con clima fresco (14 a 18 $^{\circ}\text{C}$) y humedad del suelo de moderada a alta que favorece a la germinación e infección (Maude et al 2006).

2.2.4 Métodos de control

Se han recomendado diferentes métodos para su prevención y control, entre ellas se tiene el uso de químicos (Delgadillo et al., 2002), la solarización (Pereira et al., 1996; Ulacio et al., 2006), la incorporación de materia orgánica al suelo (Pereira et al., 1996; Ulacio et al., 2003), la aplicación de antagonistas tales como *Trichoderma* (Ulacio et al., 2003; 2006), la rotación de cultivos principalmente con crucíferas, como el brócoli (Pereira et al., 1996; Ulacio et al., 2006; Zavaleta, 1999) y la aplicación de calcio (Rojas et al., 2009); las dos últimas prácticas en condiciones experimentales. No obstante, se ha demostrado que una sola alternativa de control no es suficiente para manejar al hongo y por ende, a la enfermedad que produce (Ulacio et al., 2003).

2.3 *Botrytis cinérea*.

Botrytis fue uno de los primeros géneros de hongos descritos (Garfinkel, 2021). Siendo la especie principal de este género *Botrytis cinerea*, coloquialmente conocido como

“moho gris” (Dwivedi et al., 2024). Las especies de *Botrytis spp.* son los hongos más importantes para la fitopatología por presentar una amplia gama de hospedadores y generar daños económicos inmensurables a los agricultores y productores a nivel mundial, al ser uno de los fitopatógenos más agresivos y destructivos al generar pérdidas en la producción, desde la cosecha hasta el almacenamiento y transporte, he de ahí su importancia económica (Montiel et al., 2021).

2.3.1 Taxonomía

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo (División): Dikarya

Clase: Leotiomycetes

Orden: Helotiales

Familia: Sclerotiniaceae

Género: *Botrytis*

Especie: *Botrytis cinerea* Pers.

(Index Fungorum,
2024)

2.3.2 Síntomas

Los síntomas generalmente se observan de 2 a 4 semanas después de la infección, en frutos verdes y en maduración. Las lesiones típicamente se desarrollan bajo el cáliz como pequeñas manchas marrón claro que se agrandan rápidamente e invaden el resto del fruto. Las lesiones llegan a estar completamente cubiertas con micelio oscuro que porta muchas esporas grises (conidios). Gran cantidad de esporas se liberan en forma de pinceladas grises visibles cuando se altera el fruto infectado. Eventualmente, el fruto queda totalmente cubierto y momificado. (J. C. Mertely et al 2018)

2.3.3 Ecología y epidemiología de *Botrytis spp*

B. cinerea es un hongo polífago, necrógrafo que infecta más de 200 especies vegetales distintas (Benito et al., 2000). El patógeno produce gran cantidad de micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios semejantes a un racimo de uvas (Romero, 1993) *B. cinerea* fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son diseminados por el viento. El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro. Algunas especies producen a veces una fase perfecta del tipo *Sclerotinia*, en la que las ascosporas se forman en un apotecio (Chilvers y du Toit, 2006).

2.3.4 Métodos de control

Diversas estrategias para el manejo de enfermedades han sido aplicadas con el objetivo de controlar *B. cinerea* en cultivos de fresa. No obstante, aun utilizando métodos integrados, únicamente es posible disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad; la prevención total y la erradicación del moho gris en fresa continúan siendo desafíos no alcanzados (Feliziani y Romanazzi, 2016).

Algunas de técnicas utilizadas es la eliminación de material vegetal senescente para evitar la acumulación de inóculo (Daugaard, 1999). Evitar el contacto del fruto con el suelo (por ejemplo, cubriendo las camas de plantación con películas de polietileno) es

otra práctica común para evitar infecciones por *B. cinerea*, ya que la mayor parte del inóculo está presente en el suelo y la humedad del suelo promueve la germinación de conidios (Daugaard, 1999). Seleccionar el sistema de riego adecuado puede ayudar a reducir la incidencia del moho gris; principalmente, el uso de riego por goteo y microaspersores resulta en una limitada dispersión del inóculo y reducción de películas de agua sobre el fruto (Dara et al., 2016; Terry et al., 2007). Otra de las técnicas utilizadas es hacer espaciamientos más cortos entre plantas promueven una mayor incidencia de *B. cinerea* en campo (Legard et al., 2005). Adicionalmente, los túneles plásticos pueden evitar el inóculo transportado por el aire y la incidencia de *B. cinerea* es menor en túneles sin tratamiento fungicida que en campos tratados con fungicidas (Xiao et al., 2001), las prácticas culturales son esenciales para un manejo y control de la enfermedad.

Las aplicaciones de pesticidas son la práctica de manejo más común para el control de *B. cinerea*, los principales pesticidas utilizados en la producción de fresa contra *B. cinerea* pertenecían a los grupos 1 y 2 del Comité de Acción contra la Resistencia a Fungicidas (FRAC), así como el captan (Sutton, 1990; Wedge et al., 2007, 2013). Sin embargo, debido al aumento de la resistencia a fungicidas y nuevas restricciones legales, los productores se han visto obligados a diversificar sus programas de fungicidas (Vellicce et al., 2006; Wedge et al., 2013).

Hasta la fecha, los productos de biocontrol de *B. cinerea* están mayormente basados en *Bacillus subtilis*, pero su uso en la producción comercial de fresa es limitado debido a su insuficiente aplicabilidad en campo o en la cadena de suministro (Pertot et al., 2017). No obstante, existe interés social y científico en el uso del biocontrol contra *B. cinerea* como alternativa a los pesticidas químicos.

Aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp. han mostrado alta eficiencia en el control de *B. cinerea* y se reportó que reducen la incidencia del moho gris en estambres de fresa en un 79%–93% y en frutos en un 48%–76% (Peng and Sutton, 1991).

2.4 *Neopestalotiopsis spp*

Neopestalotiopsis spp es un hongo fitopatógeno que ha sido identificado en varias regiones del mundo, incluyendo México, en Guanajuato, se han observado infecciones en cultivos de fresa, principalmente en los municipios donde la producción de esta fruta es significativa (Álvarez et al 2024).

En México, ha sido identificada como un agente causal de pudrición de raíz, pudrición de corona y mancha foliar en fresas, marcando los primeros reportes en el país de esta especie infectando cultivos de fresa (Rebollar-Alviter et al. ,2020).

2.4.1 Taxonomía

Este género pertenece a la división Ascomycota y se encuentra ubicado dentro de la familia Amphisphaeriaceae. Recientemente, (Maharachchikumbura et al. 2014) propusieron dividir el género *Pestalotiopsis* en tres en función de características morfológicas y del análisis filogenético de secuencias: *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis*. En base a ello, se distinguieron 30 clados de *Neopestalotiopsis*, 43 de *Pestalotiopsis* y 3 de *Pseudopestalotiopsis*.

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo (División): Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Amphisphaeriales

Familia: Sporocadaceae

Género: *Neopestalotiopsis*

Especie: *Neopestalotiopsis rosae*

(NCBI, 2025)

2.4.2 Síntomas

El síntoma principal se observa en hojas, y consiste en zonas internervales necróticas rojizas, de color óxido en las hojas más viejas, comenzando desde los márgenes y cubriendo toda la hoja a medida que la enfermedad avanza. Estos síntomas están asociados a áreas necróticas y decoloración de las raíces y la corona (Obregon et al., 2020). La zona necrótica puede aparecer en la parte superior o inferior de la corona, es decir que no posee un patrón de distribución. En cuanto a los frutos, frecuentemente presentan lesiones necróticas circulares a ovaladas que se extienden desde la inserción de los sépalos hacia el centro de los frutos.

Las plantas infectadas por *Neopestalotiopsis spp* suelen mostrar síntomas como manchas foliares, lesiones en tallos y frutos, y en casos severos, marchitez y muerte de la planta, estos síntomas pueden llevar a pérdidas económicas significativas para los productores, el desarrollo de este fitopatógeno es favorecido por condiciones de alta humedad y temperaturas moderadas (Baggio et al 2021).

2.4.3 Ecología y epidemiología de *Neopestalotiopsis*

El género *Neopestalotiopsis*, particularmente *Neopestalotiopsis rosae*, es considerado un patógeno emergente con amplia distribución en regiones productoras de fresa, incluyendo países como México, Estados Unidos, China, India y Alemania. Este hongo afecta principalmente a *Fragaria × ananassa*, aunque especies del género también han sido reportadas en otros hospedantes, lo que evidencia su plasticidad ecológica y capacidad de adaptación a distintos ambientes agrícolas (Rebollar-Alviter et al., 2020; Schierling et al., 2024; MDPI, 2024).

El desarrollo de *Neopestalotiopsis rosae* está fuertemente influenciado por las condiciones ambientales. Se ha reportado que temperaturas entre 25 y 30 °C, junto con niveles de humedad relativa superiores al 80% y periodos prolongados de humedad foliar, favorecen la germinación de conidios, la infección y la colonización de los tejidos del hospedante. Estas condiciones son comunes en sistemas de producción bajo invernadero o en regiones con alta humedad ambiental (Acosta-González et al., 2024; PMC, 2025).

El ciclo epidemiológico de *Neopestalotiopsis rosae* inicia con la presencia de fuentes de inóculo primario, las cuales incluyen residuos de cultivos infectados, plantas madre contaminadas y material vegetativo proveniente de viveros. Estos reservorios permiten la supervivencia del patógeno y su posterior dispersión en condiciones favorables (Rebollar-Alviter et al., 2020).

Durante la fase de reproducción, *N. rosae* produce conidios en estructuras denominadas conidiomas, los cuales contienen masas mucilaginosas que facilitan su dispersión en condiciones de humedad. Esta estrategia incrementa la eficiencia de transmisión del patógeno y contribuye a la rápida propagación de la enfermedad dentro del cultivo (MDPI, 2024).

2.4.4 Métodos de control

La infección de los cultivos de fresa por *Neopestalotiopsis* spp. está influenciada por factores como la susceptibilidad de los cultivares, el uso de plantas libres de enfermedades provenientes de viveros y la implementación de prácticas adecuadas de manejo en campo. Entre las principales estrategias de control se encuentran la eliminación de residuos vegetales infestados, el uso de plantas corredoras sanas y la verificación de su calidad mediante laboratorios autorizados, así como la asesoría técnica especializada. Además, la detección y diagnóstico temprano son fundamentales para reducir pérdidas económicas y facilitar un manejo oportuno. (Ávila-Hernández et al, 2025)

Se ha demostrado que las esporas de *Neopestalotiopsis* spp. pueden sobrevivir en el suelo y en residuos vegetales incluso después de varias temporadas de cultivo, tolerando temperaturas de hasta 40 °C; sin embargo, la fumigación del suelo previa a la plantación puede disminuir significativamente el inóculo (Maharachchikumbura, S.S.N. et al, 2011). En este sentido, se han propuesto alternativas al bromuro de metilo como 1,3-dicloropropeno, cloropicrina, dazomet, metam sódico y metam potásico, así como métodos físicos y culturales como la solarización, el tratamiento con vapor, la desinfestación anaerobia del suelo y el uso de cultivos de cobertura, los cuales también contribuyen al control de diversas plagas agrícolas (Hernández-Martínez, et al 2023).

Los tratamientos químicos aplicados al suelo antes del trasplante han demostrado eficacia en la reducción del inóculo de *Neopestalotiopsis* spp., particularmente mediante el uso de 1,3-D, cloropicrina y metam potásico, ya sea de forma individual o en combinación (Alonzo, G. et al 2024) . Asimismo, se han evaluado alternativas biológicas y naturales, como las nanoemulsiones de aceite esencial de canela, las cuales inhiben el crecimiento de *N. rosae* incluso en altas diluciones y reducen significativamente la incidencia de la enfermedad sin causar fitotoxicidad (Tran, et al 2024). De igual manera, extractos vegetales como clavo y cúrcuma han mostrado una inhibición total del crecimiento del patógeno a concentraciones elevadas, mientras que otros extractos como jengibre, hierba limón y roselle presentan niveles de inhibición superiores al 75% (Darapanit, et al 2021).

En cuanto al control químico, fungicidas como thiram e himexazol han mostrado una alta eficacia al inhibir más del 90% del crecimiento micelial *In vitro* y reducir significativamente los síntomas

en condiciones de invernadero (Essa, et al 2018). Además, diversos fungicidas como fludioxonil, fluazinam, difenoconazol, fluotriafol, miclobutanil, propiconazol, tetraconazol y triflumizole han sido reportados como altamente efectivos para inhibir el crecimiento del hongo (Baggio, et al 2023).

2.5 *Fusarium oxysporum*

El género fúngico *Fusarium* abarca varias especies fitopatógenas, que se encuentran entre los fitopatógenos más destructivos del mundo, causando enfermedades en muchos cultivos agrícolas (Burgess y Bryden, 2012)

Fusarium son hongos microscópicos comunes en plantas y vegetales cuyo desarrollo se debe a factores abióticos, como la humedad relativa elevada ($\geq 85-90\%$), temperaturas moderadas ($25-30\text{ }^{\circ}\text{C}$), viento, lluvia y horas de mojado foliar, y factores bióticos como la presencia de tejido vegetal dañado, la competencia microbiana y la actividad de insectos, aves, ácaros, roedores y otros hongos (mohos) (Pérez-Reyes et al. 2021).

Fusarium oxysporum comprende más de 100 cepas específicas de hospedadores (formas especiales), muchas de las cuales tienen distribuciones mundiales. Todas las esporas conocidas por ser producidas por *F. oxysporum*, es decir, macroconidios, microconidios y clamidosporas, están pobladas por núcleos derivados mitóticamente de las hifas sobre las que se produjeron las esporas.

Fusarium incluye hongos filamentosos que producen macroconidios con forma de “plátano”, hifas delgadas y pueden reproducirse sexual o asexualmente, generando diversas esporas que le permiten dispersarse y sobrevivir en distintos ambientes como el aire, agua, suelo, las plantas, los sustratos orgánicos y alimentos (Ekwomadu et al. 2023; Rodríguez-Grimaldo et al. 2023)

2.5.1 Taxonomía

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo (División): Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium oxysporum*

(NCBI 2025)

2.5.2 Ecología y epidemiología de *Fusarium oxysporum*

Los miembros del género *Fusarium* están ampliamente distribuidos en todas las regiones geográficas del mundo (Summerell, B.A et al 2019). Generalmente viven en el suelo o en restos vegetales, pero también se encuentran en el aire, agua, plantas e insectos (Sharma, et al 2018), donde pueden persistir durante largos periodos como clamidosporas, esclerocios o conidios (Goncharov, et al 2020).

El cambio climático tiene un impacto significativo en los ciclos de vida de los *Fusarium* fitopatógenos debido a su influencia sobre factores abióticos: aumento en la concentración de CO₂ y la temperatura, así como cambios en el régimen hídrico del suelo (Abdel-Azeem, et al 2019). También altera la supervivencia del hospedero y los mecanismos de interacción hospedero-patógeno, y posiblemente contribuye a nuevas enfermedades y cambios en la diversidad de fitopatógenos debido a variaciones en sus nichos ecológicos (Gagkaeva, et al 2014, Rousk, 2010). Esto conduce a cambios en el área de distribución de las especies, la actividad temporal y la estructura de las comunidades de patógenos fúngicos, y tiene un impacto significativo en la resistencia de las especies y en la producción de micotoxinas (Moretti, et al 2009).

2.5.4 Métodos de control

El manejo de la marchitez por *Fusarium* es una tarea compleja en diversas especies vegetales y se basa en la integración de múltiples estrategias. El objetivo principal es la

eliminación del patógeno y la reducción de la cantidad y viabilidad del inóculo fúngico (Jiménez-Díaz, et al 2015).

El control químico ha sido una de las principales estrategias contra enfermedades del suelo; sin embargo, presenta desventajas económicas, ambientales y de salud pública (Yadeta, et al 2015). Actualmente, se emplean alternativas como carbendazim, dazomet, cloropicrina y 1,3-dicloropropeno, que han mostrado eficacia en el control de la enfermedad (Ebbels, et al 1967). No obstante, su uso frecuente puede afectar comunidades microbianas del suelo, ecosistemas acuáticos y favorecer la resistencia a fungicidas (Panth, M. et al 2020, Zhao, et al 2017). Debido a estas preocupaciones, se promueve el uso de estrategias más amigables con el ambiente (Barzman, et al 2015).

El control biológico ha mostrado resultados prometedores mediante el uso de microorganismos benéficos. Hongos del género *Trichoderma* han reducido significativamente la infección en diversos cultivos (El-Hassan, et al 2013, Hervás, et al 1998). Bacterias como *Bacillus subtilis* han logrado disminuir la incidencia de la enfermedad, mientras que *Pseudomonas fluorescens* ha mostrado alta eficacia en condiciones de campo (Hervás, et al 1998, Landa, et al 2001). También se ha observado que consorcios bacterianos pueden ser más efectivos que aplicaciones individuales (Palmieri, et al 2017). Además, cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* pueden competir con las patogénicas y activar mecanismos de defensa en las plantas (Sajeena, et al 2020, Landa, et al 2009)

El control cultural también juega un papel clave, ya que las actividades humanas pueden favorecer la dispersión del patógeno (Gordon, et al 1997). El uso de semillas certificadas libres de patógenos y medidas de cuarentena son esenciales para evitar su propagación (Pande, et al 2007). Asimismo, evitar suelos infestados reduce significativamente la incidencia de la enfermedad (Haware, et al 1998). Cuando esto no es posible, prácticas como la solarización del suelo y la rotación de cultivos ayudan a disminuir el inóculo (Panth, et al 2020). Finalmente, el aumento de la materia orgánica y la biofumigación, especialmente con cultivos de Brassicaceae que producen glucosinolatos, han demostrado ser estrategias eficaces para el control de patógenos del suelo (Panth, et al 2020, Larkin, et al 2013. Prasad, et al 2007)

Literatura citada

- Abdel-Azeem, A.M.; Abdel-Azeem, M.A.; Darwish, A.G.; Nafady, N.A.; Ibrahim, N.A. Fusarium: Biodiversity, ecological significances, and industrial applications. In Recent Advancement in White Biotechnology through Fungi; Springer: Cham, Switzerland, 2019; pp. 201–261.
- Acosta-González, U., Leyva-Mir, S.G., Silva-Rojas, H.V. & Rebollar-Alviter, A. (2024). Preventive and curative effects of treatments to manage strawberry root and crown rot caused by *Neopestalotiopsis rosae*. *Plant Diseases*, 108(5), 1278–1288
- Alonzo, G.; Baggio, J.S.; Peres, N.A. Efecto de los fumigantes sobre el inóculo de *Neopestalotiopsis* spp. en coronas y suelo de fresas. *Planta Dis.* **2024**.
- Baggio, J.S., Forcelini, B.B., Wang, N.Y., Ruschel, R.G., Mertely, J.C. & Peres, N.A. (2021). Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. *Plant Disease*, 105(2), 305–315.
- Barzman, M.; Bàrberi, P.; Birch, A.N.E.; Boonekamp, P.; Dachbrodt-Saaydeh, S.; Graf, B.; Hommel, B.; Jensen, J.E.; Kiss, J.; Kudsk, P.; et al. Eight principles of integrated pest management. *Agron. Sustain. Dev.* 2015, 35, 1199–1215.
- Benito, EP, Arranz M, Eslava AP. 2000. Factores de patogenicidad de *B. cinerea*. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: S43-S46.
- Carvalho, D.D.C.; de Mello, S.C.M.; Martins, I.; Lobo, M. Biological control of Fusarium wilt on common beans by in-furrow application of *Trichoderma harzianum*. *Trop. Plant Pathol.* 2015, 40, 375–381.
- Chatterjee, S., Kuang, Y., Splivallo, R., Chatterjee, P., and Karlovsky, P. (2016). Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiol.* 16, 83–83. doi: 10.1186/s12866-016-0698-

- Chen, H.; Li, Z.; Han, Y. Synthesis and fungicidal activity against *Rhizoctonia solani* of 2-alkyl (alkylthio)-5-pyrazole-1,3,4-oxadiazoles (thiadiazoles). *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5312–5315.
- Chilvers MI, du Toit LJ. 2006. Detection and identification of *Botrytis* species associated with neck rot, scape blight, and umbel blight of onion. Recuperado de: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/2006/onion/>
- Coley, J.R., C.M. Mitchel y E.C. Sansford. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant Pathology* 39: 58-69.
- Dara, S.K., Sandoval-Solis, S. and Peck, D. (2016) Improving strawberry irrigation with micro-sprinklers and their impact on pest management. *Agric. Sci.* 07(12), 859–68. <https://doi.org/10.4236/as.2016.712078>.
- Darapanit, A.; Boonyuen, N.; Leesutthiphonchai, W.; Nuankaew, S.; Piasai, O. Identificación, patogenicidad y efectos de los extractos vegetales en la causa de enfermedades frutales por *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis*. *Sci. Rep.* **2021**, 11, 22606. Baggio, J.S.; Rebello, C.S.; de Moraes, M.B.; Marin, M.V.; Gama, A.B.; Forcelini, B.B.; Mertely, J.C.; Peres, N.A. Eficacia de fungicidas de un solo y multisitio contra *Neopestalotiopsis* spp. de fresa. *Planta Dis.* **2023**, 107, 2177–2184.
- Daugaard, H. (1999) Cultural methods for controlling *Botrytis cinerea* pers. in strawberry. *Biol. Agric. Hortic.* 16(4), 351–361. <https://doi.org/10.1080/01448765.1999.9755238>.
- Delgadillo, F., E. Zavaleta, S. Osada, A. Arévalo, V. González, D. Nieto e I. Torres. 2002. Densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y su control mediante Tebuconazol en ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana* 25: 349-354.
- Dwivedi, M., Singh, P., y Pandey, A. (2024). Botrytis fruit rot management: What have we achieved so far? *Food Microbiology*, 122, 104564. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104564>

- Ebbels, D.L. Effect of soil fumigants on Fusarium wilt and nodulation of peas (*Pisum sativum* L.). *Ann. Appl. Biol.* 1967, 60, 391–398.
- Elguero, J. Pyrazoles. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; Katritzky, A.R., Rees, C.W., Scriven, E.F.V., Eds.; Elsevier: Oxford, UK, 1996; Volume 3, pp. 1–75.
- El-Hassan, S.A.; Gowen, S.R.; Pembroke, B. Use of *Trichoderma hamatum* for biocontrol of lentil vascular wilt disease: Efficacy, mechanisms of interaction and future prospects. *J. Plant Prot. Res.* 2013, 53, 12–26.
- Essa, ayudante de trabajo; Kamel, S.M.; Ismail, A.M.; El-Ganainy, S.M. Caracterización y control químico de *Neopestalotiopsis rosae*, el agente causal de la podredumbre de raíz y corona de fresa en Egipto. *Egipto. J. Fitopatol.* 2018, 46, 1–19
- Feliziani, E. and Romanazzi, G. (2016) Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *J. Berry Res.* 6(1), 47–63. <https://doi.org/10.3233/JBR-150113>.
- Finkelstein, B.L.; Strock, C.J. Synthesis and insecticidal activity of novel pyrazole methanesulfonates. *Pestic. Sci.* 1997, 50, 324–328.
- Fustero, S.; Antonio, S.F.; Sanz-Cervera, J.F. Recent advances in the synthesis of pyrazoles. A review. *Org. Prep. Proced. Int.* 2009, 41, 253–290.
- Gagkaeva, T.Y.; Gavrilova, O.P.; Levitin, M.M. Biodiversity and distribution of the main toxigenic *Fusarium* fungi. *Biosfera* 2014, 6, 36–45
- Garfinkel, A. R. (2021). The History of Botrytis Taxonomy, the Rise of Phylogenetics, and Implications for Species Recognition. *Phytopathology®*, 111(3), 437-454. <https://doi.org/10.1094/PHYTO 06-20-0211-IA>
- Goncharov, A.A.; Glebova, A.A.; Tiunov, A.V. Trophic interactions between *Fusarium* species and soil fauna: A meta-analysis of experimental studies. *Appl. Soil Ecol.* 2020, 145, 103302.
- Gordon, T.R.; Martyn, R.D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1997, 35, 111–128.

- Haware, M.P. Diseases of chickpea. In *The Pathology of Food and Pasture Legumes*; Allen, D.J., Lenné, J.M., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 1998; pp. 473–561.
- Hernández-Martínez, N.R.; Blanchard, C.; Wells, D.; Salazar-Gutiérrez, M.R. Estado actual y perspectivas futuras de la producción comercial de fresas: una reseña. *Ciencias Horticas*. **2023**, *312*, 111893
- Index Fungorum. (2024). *Sclerotium cepivorum* Berk. Recuperado de <http://www.indexfungorum.org>
- J. C. Mertely, M. S. Oliveira, and N. A. Peres Botrytis Fruit Rot or Gray Mold of Strawberry
This document is PP230, one of a series of the Plant Pathology Department, UF/IFAS Extension. Original publication date July 2006. Revised February 2018. Visit the EDIS website at <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Jiménez-Díaz, R.M.; Castillo, P.; Jiménez-Gasco, M.d.M.; Landa, B.B.; Navas-Cortés, J.A. Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Prot.* 2015, *73*, 16–27.
- Kumar, V.; Kaur, K.; Gupta, G.K.; Sharma, A.K. Pyrazole containing natural products: Synthetic preview and biological significance. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, *69*, 735–753.
- Landa, B.B.; Navas-Cortés, J.A.; Hervás, A.; Jiménez-Díaz, R.M. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology* 2001, *91*, 807.
- Landa, B.B.; Navas-Cortés, J.A.; Jiménez-Díaz, R.M. Integrated management of Fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 2004, *94*, 946–960.
- Larkin, R.P. Green manures and plant disease management. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 2013, *8*.

- Legard, D.E., MacKenzie, S.J., Mertely, J.C., Chandler, C.K. and Peres, N.A. (2005) Development of a reduced use fungicide program for control of Botrytis fruit rot on annual winter strawberry. *Plant Dis.* 89(12), 1353–1358.
- Li, J., Gu, F., Wu, R., Yang, J., and Zhang, K. (2017). Phylogenomic evolutionary surveys of subtilase superfamily genes in fungi. *Sci. Rep.* 7:45456. doi: 10.1038/srep45456
- Li, M.; Liu, C.L.; Yang, J.C.; Zhang, J.B.; Li, Z.N.; Zhang, H.; Li, Z.M. Synthesis and biological activity of new (E)- α -(methoxyimino)benzeneacetate derivatives containing a substituted pyrazole ring. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 2664–2667.
- Maharachchikumbura, S.S.N., Guo, L.D., Cai, L., Chukeatirote, E., Wu, W.P., Sun, X., Crous, P.W., Bhat, D.J., McKenzie, E.H., Bahkali, A.H., y Hyde, K.D. 2012. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Diversity*, 56: 95-129. DOI 10.1007/s13225-012-0198-1.
- Meaza, G.; Bettarini, F.; Porta, L.P.; Piccardi, P.; Signorini, E.; Portoso, D.; Fornara, L. Synthesis and herbicide activity of novel heterocyclic protoporphyrinogen oxidase inhibitors. *Pest Manag. Sci.* 2004, 60, 1178–1188.
- Montiel, L., Vásquez, A., Montiel, L., y Vásquez, A. (2021). Botrytis cinerea, agente causal de muerte de retoños de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi en Oaxaca, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 44(2), 261-264. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.2.261>
- Moretti, A. Taxonomy of *Fusarium* genus. A continuous fight between lumpers and splitters. *Matica Srp. Proc. Nat. Sci.* 2009, 117, 7–13.
- Obregón, V.G., Ibañez, J.M. y Lattar, T.E. 2020. Guía para la identificación de las enfermedades de frutilla. INTA
- Palmieri, D.; Vitullo, D.; De Curtis, F.; Lima, G. A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against fusarium decline of chickpea. *Plant Soil* 2017, 412, 425–439. [CrossRef] 68. AbdulWahid, O.A. Improving control of *Fusarium* wilt of leguminous plants by combined application of biocontrol agents. *Phytopathol. Mediterr.* 2006, 45, 231–237.

- Pande, S.; Rao, J.N.; Sharma, M. The plant pathology journal establishment of the chickpea wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in the soil through seed transmission. *Plant Pathol. J.* 2007, 23, 3–6.
- Panth, M.; Hassler, S.C.; Baysal-Gurel, F. Methods for management of soilborne diseases in crop production. *Agriculture* 2020, 10, 16.
- Park, H.; Lee, K.; Park, S.; Ahn, B.; Lee, J.; Cho, H.Y.; Lee, K. Identification of antitumor activity of pyrazole oxime ethers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 3307–3312.
- Pereira, J.C., G.M. Chávez, L. Zambolim, K. Matsuoka, R.S. Acuna. y F.X. Do Vale. 1996. Control of *Sclerotium cepivorum* by the use of Vermicompost, solarization, *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis*. *Summa-Phytopalogica* 22: 228-234 (CAB Abstracts 1996-1998).
- Prasad, P.; Kumar, J. Management of fusarium wilt of chickpea using brassicas as biofumigants. *Legum. Res.* 2017, 40, 178–182.
- Quintanilha-Peixoto, G., Torres, R. O., Reis, I. M. A., de Oliveira, T. A. S., Bortolini, D. E., Duarte, E. A. A., et al. (2019). Calm before the storm: a glimpse into the secondary metabolism of *Aspergillus welwitschiae*, the etiologic agent of the sisal bole rot. *Toxins* 11:631. doi: 10.3390/toxins11110631
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H.V., Fuentes-Aragón, D., Acosta-González, U., Martínez-Ruiz, M. & Parra Robles, B.E. (2020). An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *Plant Disease*, 104(8), 2054-2059
- Regan, A.C. Bicyclic 5-6 Systems with One Bridgehead (Ring Junction) Nitrogen Atom: Two Extra Heteroatoms 1:1. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*; Katritzky, A.R., Ramsden, C.A., Scriven, E.F.V., Taylor, R.J.K., Eds.; Elsevier: Oxford, UK, 2008; Volume 11, pp. 551–587.

- Rojas, V., D. Ulacio, M. Sanabria y M.A. Jiménez. 2009. Efecto del calcio, *Trichoderma* y brócoli en la pared y área celular del ajo para el control de la pudrición blanca. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas 43: 183-195.
- Romero C S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo.
- Rostami, H.; Shiri, L.; Khani, Z. Recent advances in the synthesis of pyrazole scaffolds via nanoparticles: A review. Tetrahedron 2022, 110, 132688.
- Rousk, J.; Bååth, E.; Brookes, P.C.; Lauber, C.L.; Lozupone, C.; Caporaso, J.G.; Knight, R.; Fierer, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. ISME J. 2010, 4, 40–1351.
- Sajeena, A.; Nair, D.S.; Sreepavan, K. Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* as a biocontrol agent. Indian Phytopathol. 2020, 73, 177–183.
- Schierling, T.E., Voegelé, R.T. & El Hasan, A. (2024) . First report on the emergence of *Neopestalotiopsis rosae* a severe economic threat to straw berry production in Germany. Microorganisms, 13(1), 6
- Schwartz, H.F. y S. Mohan. 2008. Compendium of onion and garlic disease. American Phytopathological Society (APS). St Paul, Minnesota. 127 p.
- Sharma, L.; Marques, G. *Fusarium*, an entomopathogen—A myth or reality? Pathogens 2018, 7,
- Summerell, B.A. Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. Annu. Rev. Phytopathol. 2019, 57, 323–339.
- Sutton, J.C. (1990) Epidemiology and management of *Botrytis* leaf blight of onion and gray mold of strawberry: A comparative analysis. Can. J. Plant Pathol. 12(1), 100–110. <https://doi.org/10.1080/07060669009501048>.
- T.M. Klapötke , B. Krumm , in: Organic Azides: Azide-containing High Energy Materials, John Wiley & Sons, Ltd, 2010, pp. 389–411 .

- Terry, L.A., Chope, G.A. and Bordonaba, J.G. (2007) Effect of water deficit irrigation and inoculation with *Botrytis cinerea* on strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit quality. *J. Agric. Food Chem.* 55(26), 10812–10819. <https://doi.org/10.1021/jf072101n>.
- Tran, T.N.M.; Vu, N.B.D.; Nguyen, M.H. Actividad antifúngica de nanoemulsiones lipídicas encapsuladas en aceites esenciales contra *Neopestalotiopsis rosae* que causa manchas foliares en la fresa. *J. Plant Dis. Prot.* **2023**, 130, 823–832.
- Ulacio, D., E. Zavaleta, A. Martínez y A. Pedroza. 2006. Strategies for management of *Sclerotium cepivorum* Berk. in garlic. *Journal of Plant Pathology* 88: 253-261.
- Ulacio, D., E. Zavaleta, R. García, F. Delgadillo, A. Pedroza y A. Martínez. 2003. Materia orgánica y microorganismos antagonistas como estrategias de manejo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su impacto en el progreso de la pudrición blanca en ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 346-354.
- Wang, Y.; Zhang, W.-X.; Xi, Z. Carbodiimide-based synthesis of N-heterocycles: Moving from two classical reactive sites to chemical bond breaking/forming reaction. *Chem. Soc. Rev.* 2020, 49, 5810–5849.
- Wedge, D.E., Smith, B.J., Quebedeaux, J.P. and Constantin, R.J. (2007) Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi. *Crop Prot.* 26(9), 1449–1458. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.12.007>.
- Wu, H.; Zhang, X.; Zhang, G.A.; Zeng, S.Y.; Lin, K.C. Antifungal vapour-phase activity of a combination of allyl isothiocyanate and ethyl isothiocyanate against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* infection on apples. *J. Phytopathol.* 2011
- Xiao, C.L., Chandler, C.K., Price, J.F., Duval, J.R., Mertely, J.C. and Legard, D.E. (2001) Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. *Plant Dis.* 85(8), 901–909.
- Yadeta, K.A.; Thomma, B.P.H.J. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front. Plant Sci.* 2013, 4, 97.

- Zavaleta, E. 1999. Alternativas de manejo de enfermedades de las plantas. Terra 17: 202-220.
- Zhao, J.; Mei, Z.; Zhang, X.; Xue, C.; Zhang, C.; Ma, T.; Zhang, S. Suppression of *Fusarium wilt* of cucumber by ammonia gas fumigation via reduction of *Fusarium* population in the field. Sci. Rep. 2017, 7, 1–8.
- Zuniga, A.I.; Baggio, J.S.; Peres, N.A. Un medio semi-selectivo para evaluar la supervivencia durante el verano de *Neopestalotiopsis* sp. en campos de fresas de Florida. *Planta Dis.* **2024**, 108, 2096–2103

CAPITULO 3 ESTUDIOS *IN VITRO* DE 3 TIENIL 5 AZIDO PIRAZOL SOLA Y EN COMBINACION CON NANOPARTICULAS DE PLATA Y TEBUCONAZOL CONTRA *Sclerotium cepivorum*

Resumen

En este estudio se evaluó la actividad antifúngica de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol contra *Sclerotium cepivorum* mediante ensayos *In vitro* e *In situ*. La molécula fue evaluada individualmente y en combinación con tebuconazol y nanopartículas de plata a diferentes concentraciones, con el objetivo de determinar su efecto sobre la inhibición del crecimiento micelial del patógeno.

Los resultados *In vitro* mostraron un efecto antifúngico dependiente de la concentración. La molécula sola presentó un IC₅₀ de 5.23 ppm y alcanzó porcentajes de inhibición cercanos al 100% en las concentraciones más altas evaluadas. La combinación de 3-tienil-5-azido pirazol con tebuconazol incrementó la eficacia antifúngica, manteniendo altos niveles de inhibición micelial incluso a concentraciones reducidas, lo que evidenció un efecto sinérgico entre ambos compuestos. Por otra parte, la combinación con nanopartículas de plata presentó un IC₅₀ de 5.63 ppm, mostrando actividad antifúngica importante, aunque menor en comparación con la mezcla con tebuconazol en bajas concentraciones.

Los ensayos *In situ* realizados en condiciones de invernadero confirmaron la eficacia biológica del compuesto contra *Sclerotium cepivorum*. La aplicación de la molécula a 600 ppm presentó un control del 92%, mientras que a 60 ppm se obtuvo un control de 66%, en comparación con el testigo inoculado, el cual mostró una alta incidencia de la enfermedad confirmando la efectividad del compuesto fuera de condiciones de laboratorio.

Estos resultados indican que la molécula evaluada representa una alternativa prometedora para el control de *Sclerotium cepivorum*, especialmente en combinación con tebuconazol

3.1. Introducción

Sclerotium cepivorum mejor conocida como pudrición blanca es la principal limitante fitosanitaria del género *Allium*, debido a que el hongo afecta cualquier estado de desarrollo de la planta, produce esclerocios, estructuras de resistencia que le permite sobrevivir en el suelo que se diseminan por el agua, herramientas o equipos, y los fungicidas utilizados para el control de la enfermedad solo son efectivos en su estado vegetativo (Amin et al., 2014; Lourenço et al., 2018; Velásquez Valle et al., 2012).

Los esclerocios son estructuras ricas en nutrientes producidas por muchos hongos que les permiten permanecer latentes o inmóviles durante condiciones desfavorables. Cuando las condiciones mejoran, los esclerocios germinan para propagar el hongo patógeno (Willetts, et al 1992) Las estructuras de los esclerocios comprenden un micelio enrollado cubierto por una capa externa de melanina, formando un anillo sobre el tejido hifo (Coley-Smith, et al 1986), Esto ayuda a que los esclerodos sobrevivan en el suelo durante varios años (Coley-Smith, et al 1990). *S. cepivorum* produce esclerocios como forma de resistencia y, por ello, controlar la podredumbre blanca ha sido difícil. Los métodos físicos, químicos y biológicos no han sido completamente efectivos para reducir los ataques de *S. cepivorum* en cultivos de *Allium* (Fullerton, R et al 1990).

S. cepivorum es la fuente inicial del inóculo infeccioso y puede permanecer viable hasta 20 años en el suelo; Esta resistencia se atribuye a la capa negruzca de melanina que la cubre (Entwistle, A et al 2000). La melanina en los hongos protege contra factores físicos y químicos ambientales como el estrés oxidativo, la radiación UV, la desecación, el frío, la alta humedad, el calor y microorganismos antagonistas (Butler, M.J et al 2007, Cordero, R.J. et al 2017). La vía de melanización ayudará a comprender los mecanismos responsables de la podredumbre blanca y, así, sentará las bases para el desarrollo de estrategias que permitan controlar la infección (Coley-Smith, et al 1990).

3. Materiales y métodos

3.1 Síntesis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol

Se llevó a cabo un proceso de azidación iniciando con el enfriamiento de agua hasta alcanzar una temperatura de 5 °C o menor. Posteriormente, en un matraz balón se añadieron 50 mL de agua destilada y 8 mL de HCl. La mezcla se colocó en agitación constante utilizando una parrilla con agitación magnética durante 5 minutos. A continuación, se agregó NaNO_2 , manteniendo la agitación durante 30 minutos, hasta observar un cambio de coloración a rojo intenso. Posteriormente, se añadió NaN_3 y, finalmente, se incorporaron 25 mL de agua destilada. La mezcla se mantuvo en agitación continua durante toda la noche.

Una vez concluida la reacción, se realizó una extracción líquido-líquido. Para ello, la solución obtenida se transfirió a un matraz de decantación colocado en un soporte universal. Se añadieron 20 mL de agua Milli-Q y 27 mL de una solución saturada de NaHCO_3 , dejando reposar la mezcla aproximadamente 3 minutos. Posteriormente, se agregaron 100 mL de acetato de etilo. El sistema se agitó manualmente mediante movimientos verticales (aproximadamente 60 veces), seguido de la inversión del matraz (180°), liberando periódicamente la presión mediante la apertura de la válvula. Este procedimiento se repitió en tres ocasiones. Se procedió a la separación de fases, recuperando la fase orgánica (color café) y la fase acuosa (color rojo), considerando que el acetato de etilo presenta menor densidad que el agua. La fase acuosa se reintrodujo en el matraz de decantación y se realizaron dos lavados adicionales con 50 mL de agua destilada cada uno. La fase orgánica se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 500 mL, al que se añadió sulfato de sodio anhidro en cantidad mínima necesaria para eliminar la humedad residual. Posteriormente, la mezcla se filtró utilizando un embudo con papel filtro y se enjuagó con 10 mL de acetato de etilo. El filtrado se concentró en un matraz bola de 250 mL, llenándolo hasta aproximadamente el 70% de su volumen. Se colocó en un rotavapor operando a 800 rpm, a una presión inicial de 268 mbar y una temperatura de 42 °C. Posteriormente, la presión se redujo a 220 mbar, asegurando la eliminación total del disolvente antes de retornar a presión atmosférica (760–780 mbar). El concentrado se transfirió a un matraz bola de 100 mL y se sometió nuevamente a

rotavapor, disminuyendo gradualmente la presión hasta la obtención del producto en forma sólida. Para finalizar se realizó una TLC para verificar que el compuesto sea puro.

3.1.1 Preparación de los tratamientos

Para la evaluación antifúngica *In vitro* se utilizaron los siguientes tratamientos: PDA suplementado con 3-tienil-5-azido-pirazol solo, PDA suplementado con la mezcla 3-tienil-5-azido-pirazol + tebuconazol y PDA suplementado con la mezcla 3-tienil-5-azido-pirazol + nanopartículas de plata (AgNPs), además de un testigo absoluto sin compuestos.

El tratamiento con 3-tienil-5-azido-pirazol solo se evaluó a concentraciones de 100, 90, 70, 50, 30, 10 y 5 ppm. La mezcla con tebuconazol se preparó en la proporción correspondiente 99:1 (99% molécula 1% tebuconazol) para cada ensayo y se evaluó a las mismas concentraciones finales. En el caso de las mezclas con nanopartículas de plata, se utilizaron concentraciones de 50, 10, 5, 2.5 y 1 ppm proporción 99% molécula 1% nanopartículas de plata.

Los tratamientos fueron incorporados al medio PDA previamente esterilizado y enfriado a 45–50 °C. Posteriormente, el medio se vertió en cajas Petri estériles y, una vez solidificado, se inoculó con un disco de micelio de 5 mm de diámetro obtenido de cultivos activos de los hongos evaluados. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente y el crecimiento micelial se determinó mediante la medición radial de la colonia. Cada tratamiento contó con cuatro repeticiones

3.2 Análisis *In vitro*

3.2.1 Análisis *In vitro* de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra *Sclerotium cepivorum*

La actividad antifúngica de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol se evaluó *In vitro* contra *Sclerotium cepivorum* mediante la técnica de inhibición del crecimiento micelial.

Se prepararon 8 concentraciones (cuadro 1) de la molécula a evaluar, a partir de una solución madre, utilizando metanol como solvente. Cada concentración se incorporó al medio de cultivo previamente esterilizado (PDA) cuando éste se encontraba a una

temperatura aproximada de 45–50 °C, asegurando una distribución homogénea del compuesto.

El medio suplementado se vertió en cajas Petri estériles y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Posteriormente, en el centro de cada caja se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro de *Sclerotium cepivorum*, previamente cultivado en medio PDA.

Las cajas se incubaron a una temperatura de 25 ± 2 °C hasta que el tratamiento testigo (sin compuesto) cubrió completamente la caja Petri.

El crecimiento micelial se evaluó mediante la medición del diámetro de la colonia en dos direcciones perpendiculares, y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial en comparación con el testigo.

Cada tratamiento se realizó con cinco repeticiones y el experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar.

Cuadro 1. Concentraciones y tratamientos de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol sola.

Tratamiento	Concentración
Testigo	Agua destilada estéril
T1	100 ppm
T2	90 ppm
T3	70 ppm
T4	50 ppm
T5	30 ppm
T6	10 ppm
T7	5 ppm

T= 3 tienil 5 azido pirazol

3.2.2 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con tebuconazol contra *Sclerotium cepivorum*

Se evaluó la actividad antifúngica *In vitro* de la molécula 3-tienil-5-azido-pirazol en combinación con tebuconazol frente a *Sclerotium cepivorum*, mediante el método de crecimiento radial en medio de cultivo.

Se prepararon soluciones de la molécula en diferentes concentraciones (cuadro 2). Para la preparación de las mezclas, se consideró una proporción 99:1, donde el 99% correspondió al azido pirazol, por ser la molécula de interés, y el 1% al tebuconazol, utilizado como fungicida comercial.

Para ello, las cantidades previamente calculadas para cada concentración se ajustaron multiplicando por 0.99 en el caso del azido pirazol y por 0.01 para el tebuconazol, obteniéndose así las concentraciones finales de cada tratamiento.

Cuadro 2. Concentraciones y tratamientos de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol sola.

Tratamiento	Concentración de la mezcla	Concentración final
Testigo	Agua destilada estéril	Control
T1	9.9 mg AZP + 0.1 mg t	100 ppm
T2	8.91 mg AZP + 0.09 mg t	90 ppm
T3	6.93 mg AZP + 0.07 mg t	70 ppm
T4	4.95 mg AZ P+ 0.05 mg t	50 ppm
T5	2.97 mg AZP + 0.03 mg t	30 ppm
T6	0.99 mg AZP + 0.01 mg t	10 ppm
T7	0.48 mg ARP + 0.005 mg t	5 ppm

AZP= 3 tienil 5 azido pirazol, t= tebuconazol

3.2.3 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con Nanopartículas de plata contra *Sclerotium cepivorum*

Se evaluó la actividad antifúngica *In vitro* de la molécula 3-tienil-5-azido-pirazol en combinación con nanopartículas de plata con un tamaño promedio de 20 nm frente a *Sclerotium cepivorum*, mediante el método de crecimiento radial en medio de cultivo.

Se prepararon soluciones de la molécula en diferentes concentraciones (cuadro 3). Para la preparación de las mezclas, se consideró una proporción 99:1, donde el 99% correspondió al azido pirazol y el 1% a las nanopartículas de plata.

Las nanopartículas de plata se emplearon tenían una concentración de 0.02 mg/ml a partir de la cual se realizaron las diluciones necesarias para obtener la concentración correspondiente al 1% en cada tratamiento.

Cuadro 3: Concentraciones y tratamientos de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con Nanopartículas de plata

Tratamiento	Concentración de la mezcla	Concentración base
Testigo	Agua destilada estéril	Control
T1	6.93 mg ARP + 2.5 ml Ag	50 ppm
T2	0.99 mg ARP + 0.5 ml Ag	10 ppm
T3	0.48 mg ARP + 0.25 ml Ag	5 ppm
T4	0.24 mg ARP + 0.175 ml Ag	2.5 ppm
T5	0.09 mg ARP + 0.05 ml Ag	1 ppm

ARP= 3 tienil 5 azido pirazol, Ag= Nanopartículas de plata

3.3 Análisis *In situ*

3.3.1 Establecimiento del protocolo experimental

El experimento se llevó a cabo utilizando un diseño completamente al azar, lo cual permitió controlar las posibles fuentes de variación externa y asegurar la validez de los resultados obtenidos.

Se evaluó la actividad de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol aplicada de manera individual en tres diferentes concentraciones: 1000 ppm, 100 ppm y 10 ppm. Esto permitió analizar el efecto de cada dosis sobre las variables estudiadas.

Cada tratamiento estuvo conformado por cinco repeticiones y, en cada repetición consistió en una unidad experimental integrada por 10 plantas de cebollín obteniendo un total de 50 plantas por tratamiento, asimismo se incluyó un tratamiento testigo sin aplicación de molécula para poder realizar la comparación correspondiente.

El suelo utilizado fue previamente desinfectado mediante la aplicación de peróxido de hidrógeno al 50%, con el fin de eliminar microorganismos contaminantes, Posteriormente en ese suelo se sembraron bulbos de cebollín en maceras de 2 kg los cuales fueron regados hasta alcanzar capacidad de campo, asegurando condiciones óptimas para el desarrollo de las plantas y la evaluación del tratamiento.

3.3.1 Inoculación del patógeno

El inóculo de *Sclerotium cepivorum* se obtuvo a partir de cultivos activos desarrollados en medio papa dextrosa agar (PDA) hasta obtener un crecimiento adecuado y la formación de esclerocios.

De acuerdo con lo reportado por Delgadillo Sanchez en el 2002 densidades superiores a 20 esclerocios pueden generar hasta un 98 % de incidencia de la enfermedad. Con base en esta referencia, se inocularon 40 esclerocios por maceta, con el objetivo de

asegurar una presión de inóculo suficiente y homogénea para la evaluación de los tratamientos.

Los esclerocios se incorporaron en macetas con capacidad de 2 kg de suelo, distribuyéndose de manera uniforme en la zona radicular para favorecer el contacto con las raíces y promover la infección del patógeno.

3.4.1 Aplicación del tratamiento

Para la aplicación de los tratamientos, se prepararon soluciones de la molécula 3-tienil-5-azido-pirazol en tres concentraciones: 600 ppm, 60 ppm y 6 ppm. Estas soluciones se administraron directamente en la base de las plantas, procurando una distribución uniforme en la zona radicular para maximizar el contacto entre la sustancia y las raíces. Se realizaron dos aplicaciones: la primera se efectuó una vez establecido el experimento, y la segunda se llevó a cabo 15 días después de la aplicación inicial. Este procedimiento permitió asegurar que las plantas recibieran el tratamiento en momentos clave de su desarrollo y bajo condiciones controladas.

3.4.2 Evaluación de incidencia

La incidencia de la enfermedad se determinó como el porcentaje de plantas que presentaron síntomas de infección por *Sclerotium cepivorum* en cada repetición.

Las evaluaciones se realizaron de manera periódica después de la inoculación y durante el desarrollo del experimento.

3.4.3 Análisis estadístico

En el análisis estadístico se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de los tratamientos sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico. Primero se calcularon los promedios de inhibición a partir de las tres réplicas por concentración. Después se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk para revisar si los datos cumplían el supuesto de distribución normal; sin embargo, debido al tamaño muestral pequeño, la presencia de valores repetidos de 0% o 100% y la desviación de normalidad

en los residuales, se decidió utilizar pruebas no paramétricas. Por ello, se aplicó Kruskal–Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas, y Jonckheere–Terpstra para comprobar si la inhibición aumentaba de manera ordenada conforme aumentaba la concentración. Además, se ajustó un modelo dosis–respuesta log-logístico para estimar el IC_{50} , que representa la concentración necesaria para alcanzar el 50% de inhibición. Este enfoque permitió evaluar tanto la significancia estadística del efecto inhibitorio como la potencia relativa de cada tratamiento frente a los hongos estudiados.

3.5. Resultados

3.5.1 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra *Sclerotium cepivorum*

El análisis *In vitro* de la molécula 3-tienil-5-azido-pirazol mostró un efecto inhibitorio dependiente de la concentración sobre el crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum*. Se observaron diferencias claras entre los tratamientos evaluados (Cuadro 4).

Las concentraciones más altas (100, 90, 70 y 50 ppm) presentaron una inhibición del 100% del crecimiento micelial en todas las repeticiones, evidenciando un efecto fungicida completo bajo las condiciones del ensayo. Este efecto se observa claramente en la Figura 1, donde no se presenta crecimiento micelial en las cajas Petri correspondientes a dichas concentraciones.

En contraste, las concentraciones menores (30, 10 y 5 ppm) mostraron una disminución progresiva en el porcentaje de inhibición. Específicamente, la concentración de 30 ppm alcanzó un valor promedio de inhibición de 78.80%, mientras que a 10 ppm se registró un 63.35%. Finalmente, la concentración más baja evaluada (5 ppm) presentó un promedio de inhibición de 52.58%, evidenciando una reducción notable en la eficacia del compuesto.

Estos resultados evidencian una relación directa entre la concentración del compuesto y su capacidad para inhibir el crecimiento micelial del patógeno. Esta tendencia se

representa de manera más clara en la Figura 2, donde se muestra la curva dosis–respuesta ajustada mediante un modelo logístico.

A partir de este modelo, se estimó una concentración inhibitoria media (IC_{50}) de 5.32 ppm, (cuadro 4) lo que indica que el compuesto presenta una alta actividad antifúngica incluso a bajas concentraciones.

Cuadro 4. Porcentajes de inhibición de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra *Sclerotium cepivorum*

Tratamientos	Porcentaje de inhibición (Primera repetición)	Porcentaje de inhibición (Segunda repetición)	Porcentaje de inhibición (Tercera repetición)	Promedio
100 ppm	100	100	100	100.00
90 ppm	100	100	100	100.00
70 ppm	100	100	100	100.00
50 ppm	100	100	100	100.00
30 ppm	73.9	82.05	80.44	78.80
10 ppm	66.2	60.28	63.56	63.35
5 ppm	48.6	68.8	40.33	52.58

Todos los tratamientos se realizaron con la molécula 3 tienil 5 azido pirazol sola

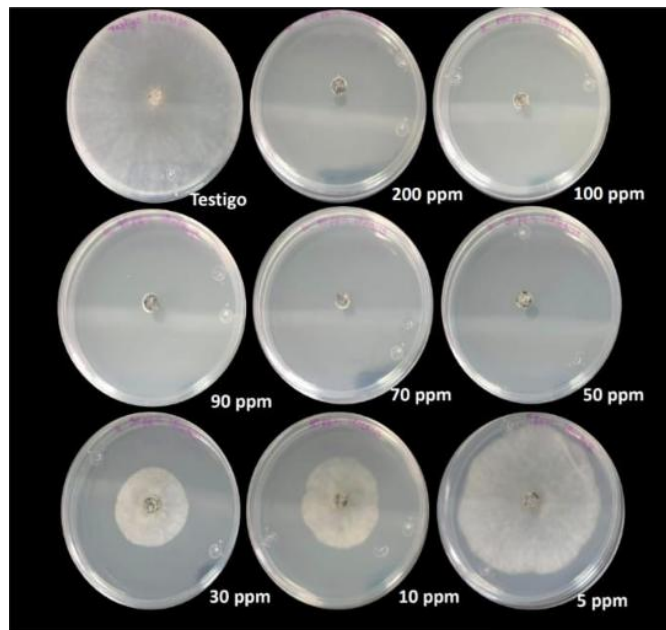


Figura 1: Crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* en cajas Petri bajo diferentes concentraciones del tratamiento de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol

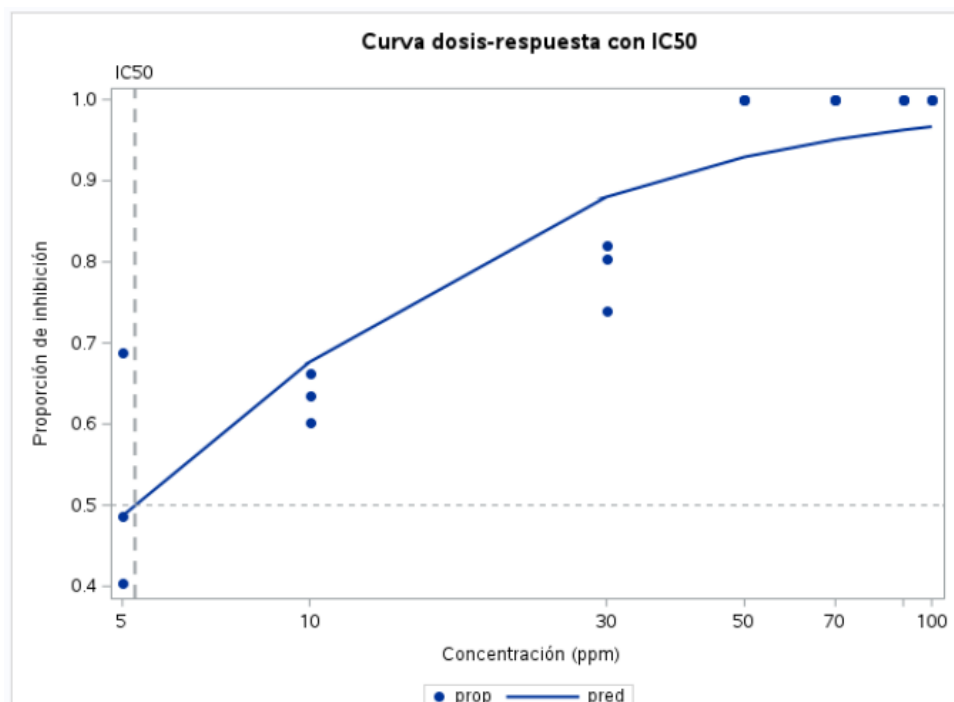


Figura 2: Análisis de la concentración mínima inhibitoria al 50% a partir de datos experimentales de imbibición micelial de *Sclerotium cepivorum* tratados con la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol con un resultado de 5.23 ppm.

Debido a la falta de normalidad en los residuales y a la presencia de un patrón de saturación en las dosis altas, se aplicaron dos pruebas no paramétricas: Kruskal–Wallis para diferencias globales entre concentraciones y Jonckheere–Terpstra para evaluar una tendencia ordenada creciente.

Cuadro 5: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol

Prueba	n	Estadístico	gl	p	Conclusión
Kruskal–Wallis	21	H = 19.43	6	.004	Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas.
Jonckheere–Terpstra	21	J = 159.00	—	< .001	Se observó una tendencia creciente significativa del porcentaje de inhibición al aumentar la concentración del antígeno.

Nota. Se analizaron siete concentraciones con tres réplicas por grupo (n total = 21). Para Jonckheere–Terpstra se asumió una alternativa creciente, coherente con la hipótesis de respuesta dosis–dependiente.

3.5.2 Gráficos representativos

A continuación, se incluyen los gráficos elaborados para mostrar la distribución de los datos, la tendencia dosis–respuesta y la figura más contundente para evidenciar el efecto logrado.

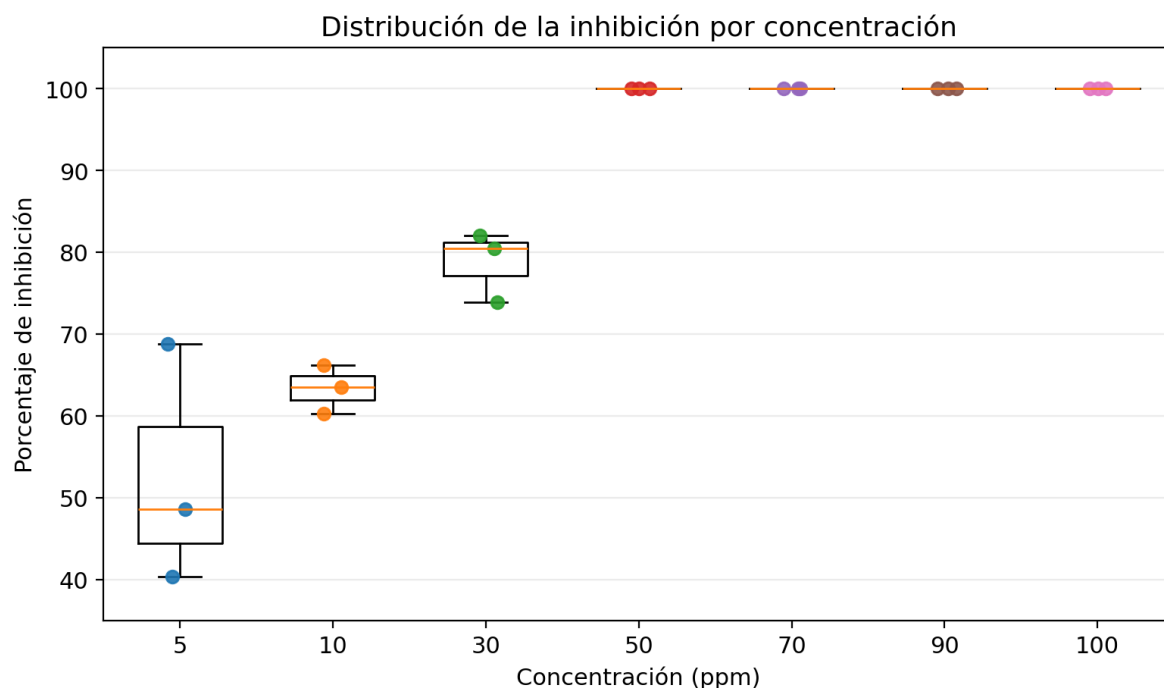


Figura 3. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración de la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol contra *Sclerotium cepivorum*

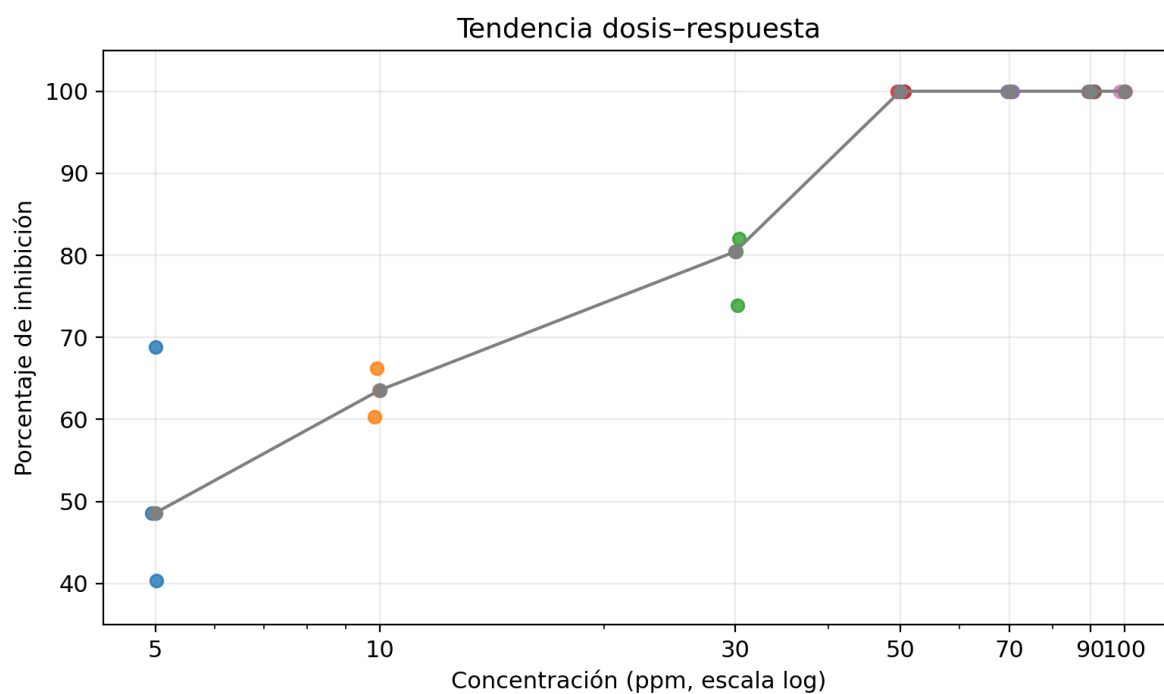


Figura 4. Tendencia dosis-respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración de la molécula de la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol contra *Sclerotium cepivorum*

La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas, $H(6) = 19.43$, $p = .004$. Además, la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia creciente significativa en el porcentaje de inhibición a medida que aumentó la concentración del antígeno, $J = 159.00$, $p < .001$. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, la molécula 3 tienil 5 azido pirazol mostró un efecto inhibitorio creciente y marcado sobre el crecimiento micelial del hongo *Sclerotium cepivorum* conforme aumentó la concentración.

Los datos muestran un patrón consistente de respuesta dosis–dependiente: la inhibición aumenta de 5 a 30 ppm y luego se estabiliza en 100% a partir de 50 ppm. Este comportamiento refuerza la interpretación de un efecto fuerte y sostenido de la molécula.

3.6 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con tebuconazol contra *Sclerotium cepivorum*

Los resultados del análisis *In vitro* de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol en combinación con tebuconazol mostraron un incremento notable en la eficacia antifúngica en comparación con la molécula evaluada de manera individual (Cuadro 6).

Como se observa en el cuadro 5, las concentraciones de 100, 90, 70, 50 y 30 ppm presentaron una inhibición del 100% del crecimiento micelial, lo que indica una alta efectividad del tratamiento combinado incluso a concentraciones intermedias. Este comportamiento sugiere un posible efecto sinérgico entre la molécula y el tebuconazol. En la figura 5 podemos observar inhibición micelial disminuye en cada uno de los tratamientos aplicados

Cuadro 6: Efecto antifúngico de la combinación de 3-tienil-5-azido pirazol y tebuconazol sobre el crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* en condiciones *In vitro*.

Concentración	Porcentaje de inhibición (Primera rep)	Porcentaje de inhibición (Segunda rep)	Porcentaje de inhibición (Tercera rep)	Promedio
100 ppm	100	100	100	100.00
90 ppm	100	100	100	100.00
70 ppm	100	100	100	100.00
50 ppm	100	100	100	100.00
30 ppm	100	100	100	100.00
10 ppm	98.87	96.65	93.56	96.36
5 ppm	81.18	76.78	70.45	76.14

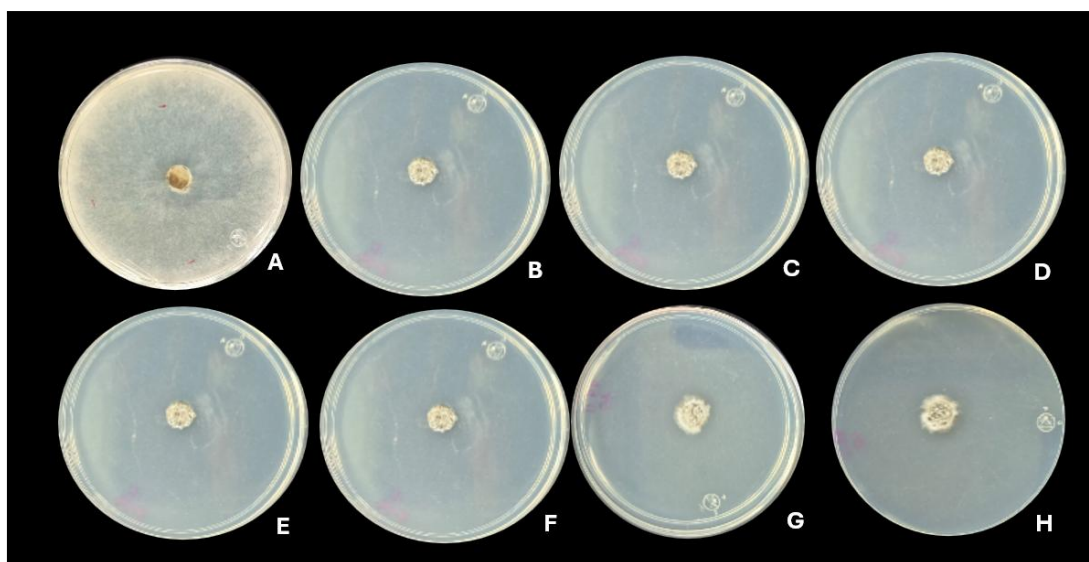


Figura 5: Crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* en cajas Petri donde A=Testigo, B =9.9 mg AZP + 0.1 mg t, C= 8.91 mg AZP + 0.09 mg t, D 6.93 mg AZP + 0.07 mg t, E= 4.95 mg AZP+ 0.05 mg t F=2.97 mg AZP + 0.03 mg t G=0.99 mg AZP + 0.01 mg t H=0.48

Debido a la falta de normalidad en los residuales y a la presencia de saturación en las concentraciones altas, se aplicaron dos pruebas no paramétricas: Kruskal–Wallis para

diferencias globales entre concentraciones y Jonckheere–Terpstra para evaluar una tendencia ordenada creciente.

Cuadro 7: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración

Prueba	n	Estadístico	gl	p	Conclusión
Kruskal–Wallis	21	H = 19.84	6	.003	Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas.
Jonckheere–Terpstra	21	J = 144.00	—	< .001	Se observó una tendencia creciente significativa del porcentaje de inhibición al aumentar la concentración.

Nota. Se analizaron siete concentraciones con tres réplicas por grupo (n total = 21). Para Jonckheere–Terpstra se asumió una alternativa creciente, coherente con la hipótesis de respuesta dosis–dependiente. El valor p de tendencia se reporta como $p < .001$ debido a la evidencia extrema de ordenamiento ascendente.

3.6.1 Gráficos representativos

A continuación, se incluyen los gráficos elaborados para mostrar la distribución de los datos, la tendencia dosis–respuesta y la figura más contundente para evidenciar el efecto logrado.

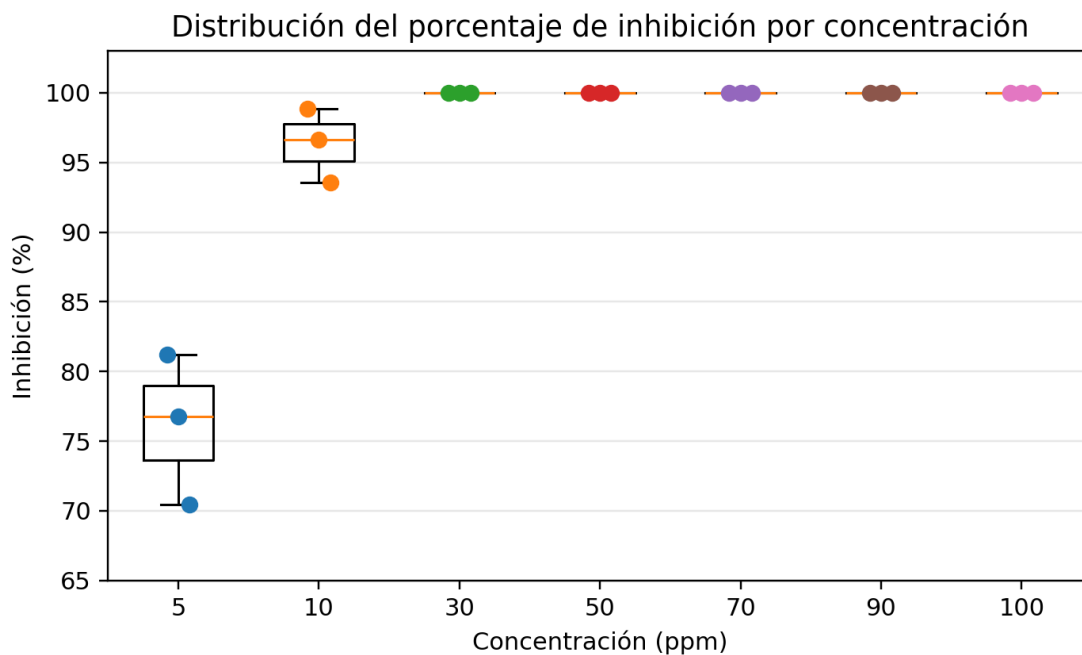


Figura 6. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración (3 tienil 5 azido pirazol con Tebuconazol contra *Sclerotium cepivorum*)

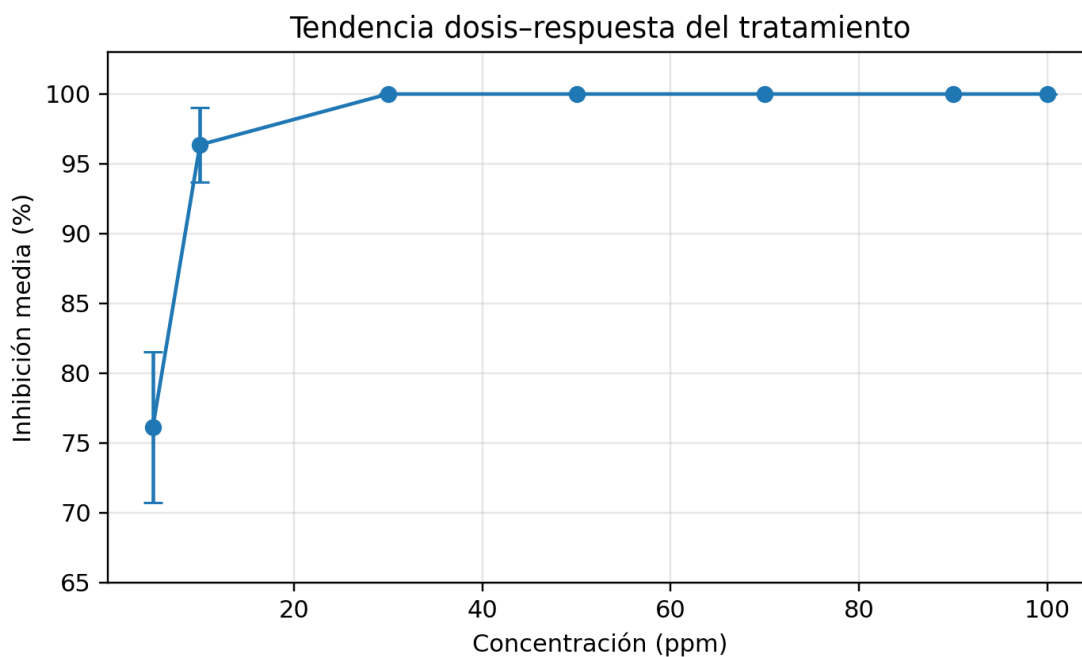


Figura 7. Tendencia dosis-respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración (3 tienil 5 azido pirazol con Tebuconazol contra *Sclerotium cepivorum*)

La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas, $H(6) = 19.84$, $p = .003$. Además, la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia creciente significativa en el porcentaje de inhibición a medida que aumentó la concentración del tratamiento, $J = 144.00$, $p < .001$. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, 3-tienil-5-azido pirazol con tebuconazol mostró un efecto inhibitorio creciente y marcado contra *Sclerotium cepivorum* conforme aumentó la concentración.

Los datos muestran un patrón consistente de respuesta dosis–dependiente: la inhibición aumenta de 5 a 10 ppm y alcanza 100% desde 30 ppm, manteniéndose en ese nivel hasta 100 ppm. Este comportamiento refuerza la interpretación de un efecto fuerte y sostenido del tratamiento sobre el crecimiento fúngico.

3.7 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con Nanopartículas de plata contra *Sclerotium cepivorum*

Los resultados del análisis *In vitro* de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol en combinación con nanopartículas de plata de con un tamaño de 20 nm a una concentración de 0.02 mg/ml mostraron un efecto antifúngico dependiente de la concentración sobre el crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* (Cuadro 6).

Como se observa en el Cuadro 6, la concentración de 50 ppm presentó una inhibición del 100%, indicando una alta eficacia del tratamiento a concentraciones elevadas. Sin embargo, a diferencia de la combinación con tebuconazol, la eficacia disminuyó conforme se redujo la concentración.

A 10 ppm, se obtuvo un promedio de 79.78% de inhibición, mientras que a 5 ppm la inhibición fue de 46.40%, evidenciando una reducción considerable en la actividad antifúngica. En concentraciones aún menores (2.5 y 1 ppm), no se observó inhibición del crecimiento micelial, registrándose valores de 0%.

Esta tendencia se observa de manera clara en la Figura 9, donde la inhibición micelial disminuye progresivamente conforme se reduce la concentración del tratamiento.

A partir del ajuste de la curva dosis–respuesta, se estimó una concentración inhibitoria media (IC_{50}) de 5.63 ppm,

Cuadro 8: Efecto antifúngico de la combinación de 3-tienil-5-azido pirazol y Nanopartículas de plata a una concentración de 0.02 mg/ml sobre el crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* en condiciones *In vitro*.

Concentración total	Porcentaje de inhibición (Primera rep)	Porcentaje de inhibición (Segunda rep)	Porcentaje de inhibición (Tercera rep)	Promedio
50 ppm	100	100	100	100.00
10 ppm	78.66	81.45	79.22	79.78
5 ppm	46.89	44.67	47.64	46.40
2.5 ppm	0	0	0	0.00
1 ppm	0	0	0	0.00

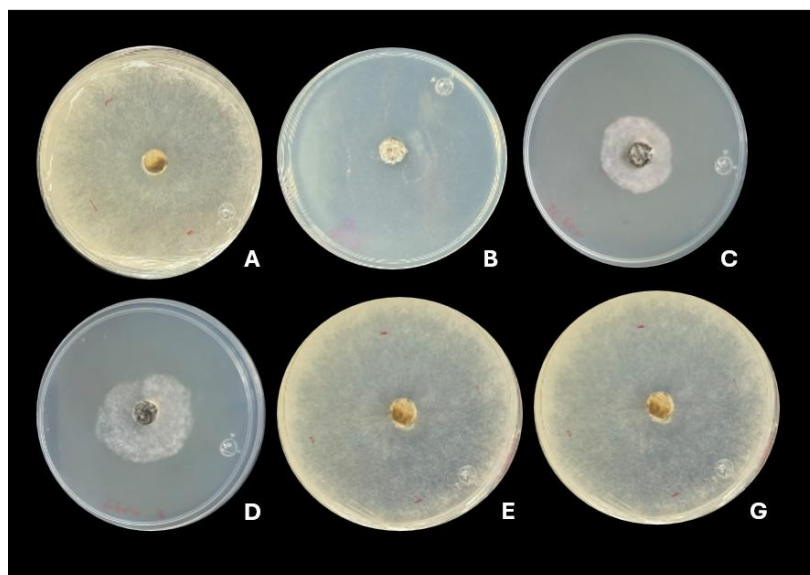


Figura 9 : Crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* en cajas Petri donde A=Testigo, B=6.93 mg ARP + 2.5 ml Ag C=0.99 mg ARP + 0.5 ml Ag, D=0.48 mg ARP + 0.25 ml Ag, E=0.24 mg ARP + 0.175 ml Ag, G=0.09 mg ARP + 0.05 ml Ag

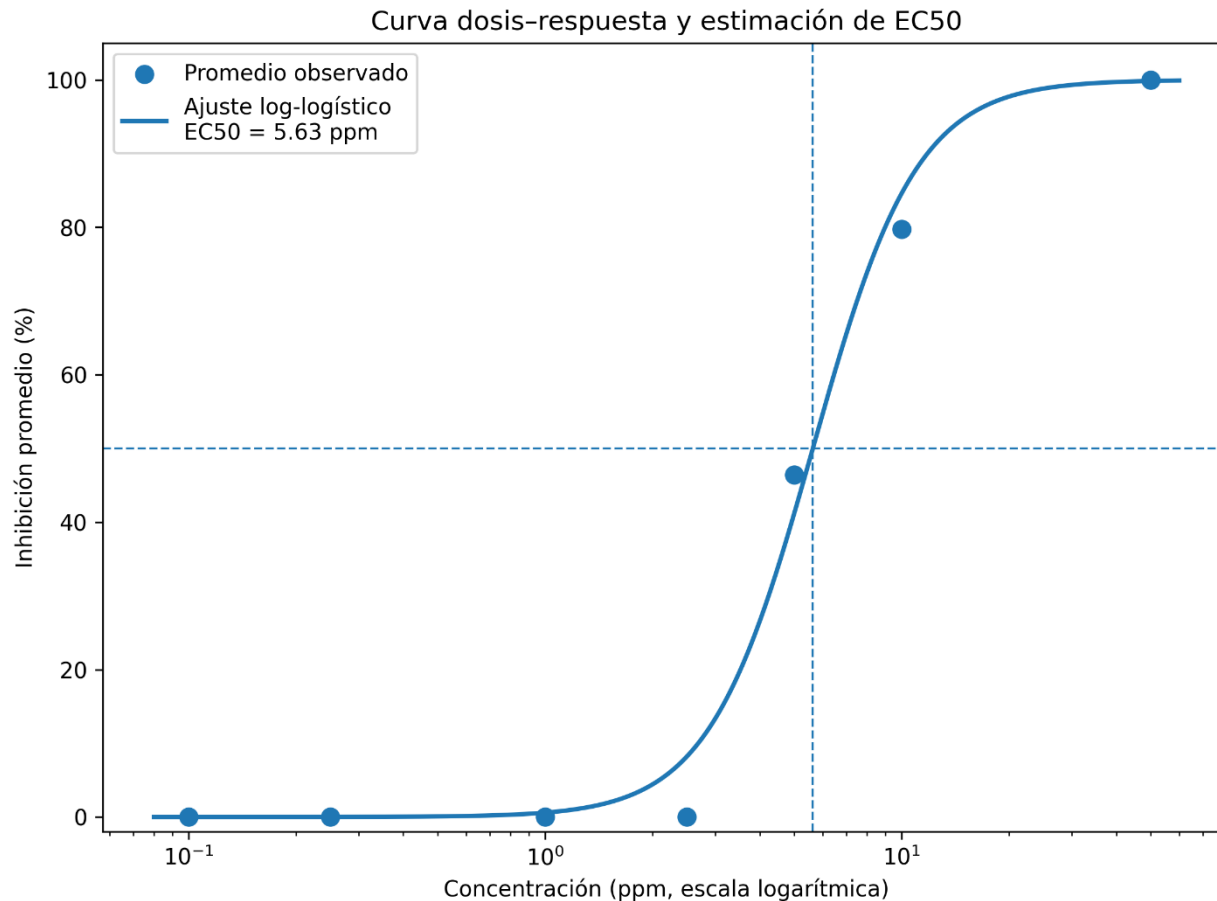


Figura 10: Análisis de la concentración mínima inhibitoria al 50% a partir de datos experimentales de imbibición micelial de *Sclerotium cepivorum* tratados con la molécula 3 tienil 5 azido pirazol más nanopartículas de plata. La estimación de IC₅₀ fue de 5.63 ppm

3.8 Análisis de la aplicación de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol a nivel invernadero

Los resultados del ensayo *In situ* mostraron un efecto dependiente de la concentración de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol sobre la incidencia de *Sclerotium cepivorum*.

A la concentración de 600 ppm, se registraron 46 plantas sanas y 4 enfermas, lo que corresponde a una incidencia del 8% y un control del 92%, indicando un alto nivel de control del patógeno.

En la concentración de 60 ppm, se observaron 33 plantas sanas y 17 enfermas, lo que representa una incidencia del 34% y una sanidad del 66%, mostrando una disminución en la eficacia del tratamiento en comparación con la dosis más alta.

Por otro lado, a 6 ppm, se registraron únicamente 9 plantas sanas y 41 enfermas, lo que equivale a una incidencia del 82% y una sanidad del 18%, evidenciando una baja efectividad en el control de la enfermedad a esta concentración. Además de la incidencia y sanidad registrada, se observaron diferencias importantes entre tratamientos. Las plantas tratadas con 600 ppm mostraron mayor vigor vegetativo, raíces con menor grado de pudrición y ausencia visible de micelio blanco característico de *Sclerotium cepivorum* durante gran parte del experimento. Los primeros síntomas de marchitez y pudrición se observaron aproximadamente 18–20 días después de la inoculación, evidenciando un retraso en el desarrollo de la enfermedad en comparación con el testigo positivo.

En el tratamiento de 60 ppm, los síntomas aparecieron entre los 12 y 15 días posteriores a la inoculación. Por otro lado, las plantas tratadas con 6 ppm presentaron síntomas severos de marchitez, amarillamiento y pudrición radical entre los 7 y 10 días después de la inoculación, mostrando un comportamiento similar al testigo positivo. En estas plantas se observó abundante crecimiento micelial y deterioro del sistema radicular.

En términos generales, las concentraciones más altas retrasaron el desarrollo de síntomas y disminuyeron la severidad de la enfermedad, indicando un efecto protector dependiente de la dosis aplicada. En general, los resultados indican que la molécula presenta una alta eficacia a concentraciones elevadas, mientras que su efectividad disminuye al reducir la dosis, lo que sugiere una relación directamente proporcional entre la concentración aplicada y el nivel de control de *S. cepivorum* bajo condiciones *In situ*. En la figura 11 se puede observar las diferencias entre el testigo negativo positivo y las 3 diferentes dosis aplicadas de la molécula

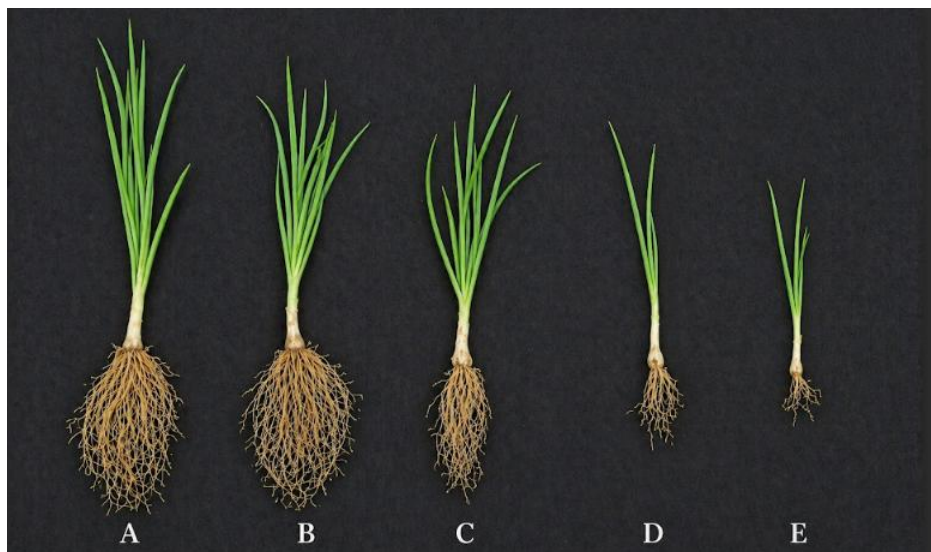


Figura 11: plantas representativas de las 3 dosis aplicadas donde A: testigo negativo B: 600 ppm de la molécula C: 60 ppm, D: 6 ppm y E: testigo positivo

3.9. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la molécula 3-tienil-5-azido pirazol presenta un efecto antifúngico significativo contra *Sclerotium cepivorum*, el cual se incrementa conforme aumenta la concentración del tratamiento, evidenciando un comportamiento dosis-dependiente. Los compuestos que contienen el anillo de pirazol han mostrado actividad antifúngica mediante la inhibición de la biosíntesis de ergosterol y la inhibición de la formación de biopelículas (Walunj, et al 2023). Se observó que la inhibición del crecimiento micelial alcanzó valores del 100% a partir de concentraciones intermedias, lo que sugiere un efecto fungicida.

La combinación de la molécula con tebuconazol mostró un incremento en la eficacia antifúngica, alcanzando inhibición total incluso a concentraciones más bajas en comparación con la molécula sola. Este comportamiento sugiere un posible efecto sinérgico entre ambos compuestos, lo cual coincide con lo reportado para fungicidas del

grupo de los triazoles que actúan como inhibidores de la biosíntesis de ergosterol y constituyen la terapia de primera línea para infecciones fúngicas invasivas (Rybak, et al 2024). La interacción entre diferentes modos de acción puede potenciar el efecto antifúngico y reducir la probabilidad de generar resistencia.

Por otro lado, la combinación del 3 tienil 5 azido pirazol con nanopartículas incorporadas al medio PDA de plata también presentó actividad antifúngica dependiente de la concentración, aunque con menor eficacia a bajas dosis. Este comportamiento sugiere que, aunque las nanopartículas de plata poseen propiedades antimicrobianas, su efecto en este sistema puede depender de factores como la concentración, tamaño de partícula y disponibilidad del compuesto activo. Diversos estudios sugieren que las AgNPs inducen estrés oxidativo al alterar sus macromoléculas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando oxidación lipídica y peroxidación de proteínas mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yu et al., 2020). Estas ROS suprimen los mecanismos de defensa antioxidante y causan daño estructural en las membranas a través de la oxidación de biomoléculas (Dumanović et al. 2021). Los resultados confirmaron diferencias significativas entre tratamientos y una tendencia creciente en la inhibición conforme aumenta la concentración, lo que respalda la hipótesis planteada.

Además de los resultados obtenidos en condiciones *In vitro*, el ensayo *In situ* permitió confirmar que la molécula 3-tienil-5-azido pirazol también presentó efecto sobre la incidencia de *Sclerotium cepivorum* bajo condiciones de invernadero. La respuesta observada fue dependiente de la concentración, ya que a 600 ppm se registró una sanidad del 92% y una incidencia de solo 8%, mientras que a 60 ppm la sanidad disminuyó a 66% y la incidencia aumentó a 34%. En contraste, a 6 ppm se observó una baja eficacia del tratamiento, con 82% de incidencia y únicamente 18% de plantas sanas. Estos resultados indican que la molécula conserva actividad biológica fuera del sistema controlado de laboratorio, aunque su eficacia depende directamente de la dosis aplicada. Esto es relevante debido a que *S. cepivorum* produce esclerocios capaces de permanecer viables durante largos periodos en el suelo, lo que dificulta su manejo mediante estrategias convencionales (Coley-Smith, et al 1990).

3.10 Conclusión

La combinación *in vitro* de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol mas tebuconazol controlo en una proporción de 99:1 (molécula 3 tienil 5 azido pirazol y tebuconazol), respectivamente mostro un control a partir de 30 a 100 ppm en un 100% a *Sclerotium cepivorum*, con la dosis de 10 ppm mostro una inhibición de 96.4%. La IC₅₀ de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol más nanopartículas de plata fue de 5.65 ppm

En el ensayo *In situ*, la molécula 3-tienil-5-azido pirazol mostro un control del 92% a 600 ppm. En resumen, la molécula 3-tienil-5-azido pirazol, especialmente en combinación con tebuconazol, se posiciona como una alternativa viable para el desarrollo de nuevas estrategias de control de *Sclerotium cepivorum*.

Literatura citada

- Amin, M., Tadele, S., & Selvaraj, T. (2014). White rot (*Sclerotium cepivorum*-Berk) an aggressive pest of onion and garlic in Ethiopia: An overview. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, 6(1), 6-15. <https://doi.org/10.5897/JABSD2013.0210>
- Butler, M.J.; Gardiner, R.B.; Day, A.W. Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia* 2009, 101, 296–304.
- Coley-Smith, J. White rot disease of *Allium*: Problems of soil-borne diseases in microcosm. *Plant Pathol.* 1990, 39, 214–222
- Coley-Smith, J.R.; Parfitt, D. Some effects of diallyl bisulphide on sclerotia of *Sclerotium cepivorum*: Possible novel control method for white rot disease of onions. *Pestic. Sci.* 1986, 17, 587–594.
- Cordero, R.J.; Casadevall, A. Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biol. Rev.* 2017, 31, 99–112.

- Devanesan S, Jayamala M, AlSalhi MS, Umamaheshwari S, Ranjit singh AJA (2021) Antimicrobial and anticancer properties of Carica papaya leaves derived di-methyl flubendazole mediated silver nanoparticles. *J Infect Public Health* 14(5):577–587
- Elsaman, H., Golubtsov, E., Brazil, S., Ng, N., Klugherz, I., Dichtl, K., Müller, C., & Wagener, J. (2024). Toxic eburicol accumulation drives the antifungal activity of azoles against *Aspergillus fumigatus*. *Nature Communications*, 15. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50609-1>.
- Entwistle, A. Allium white rot and its control. *Soil Use Manag.* 1990, 6, 201–208.
- Fullerton, R.; Stewart, A. Chemical control of onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) in the Pukekohe district of New Zealand. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 1991, 19, 121–127.
- Lourenço, V., Vieira, B. S., Lopes, E. A., & Villalta, O. N. (2018). Etiology, epidemiology, and management of white rot on onion and garlic: Current knowledge and future directions for Brazil. *Cientifica*, 46(3), 241-256. <http://doi.org/10.15361/1984-5529.2018v46n3p241-256>
- Walunj, Y.; Nandurkar, Y.; Shinde, A.; Jagadale, S.; Shaikh, A. L. N.; Modak, M.; Mhaske, P. C. Synthesis, antimicrobial and ergosterol biosynthesis inhibition activity of clubbed 1,1'-biphenyl-pyrazole derivatives. *New J. Chem.* 2023, 47, 3810–3824.
- Willetts, H.; Bullock, S. Developmental biology of sclerotia. *Mycol. Res.* 1992, 96, 801–816.
- Yu Z, Li Q, Wang J, Yu Y, Wang Y, Zhou Q, Li P (2020) Reactive oxygen species-related nanoparticle toxicity in the biomedical field. *Nanoscale Res Lett* 15(1):1–14

CAPITULO 4 ESTUDIOS *IN VITRO* DE 3 TIENIL 5 AZIDO PIRAZOL SOLA Y EN COMBINACION CON NANOPATILUAS DE PLATA Y TEBUCONAZOL CONTRA *Botrytis spp*

Resumen

Se evaluó la actividad antifúngica de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol contra *Botrytis spp*, en condiciones *In vitro*, tanto de manera individual como en combinación con tebuconazol y nanopartículas de plata.

Los resultados evidenciaron una clara relación dosis–respuesta, con altos niveles de inhibición a concentraciones elevadas y una disminución progresiva a dosis bajas. En comparación con *Sclerotium cepivorum*, *Botrytis spp*. mostró una menor sensibilidad al tratamiento.

La combinación con tebuconazol mejoró la actividad antifúngica, sugiriendo un efecto complementario, mientras que la combinación con nanopartículas de plata mostró una inhibición moderada dependiente de la concentración. El valor de IC₅₀ se estimó entre 7 y 10 ppm.

Los resultados indican que la molécula presenta potencial antifúngico contra *Botrytis spp*, aunque su eficacia depende de la concentración y de las características biológicas del patógeno.

4.1 Introducción

Botrytis spp, es un grupo de hongos (Hyphomycetes) caracterizado por incluir varias especies fitopatógenas que causan daños severos en los cultivos (Choquer, et al 2007, Bi, K et al 2022). Casi 600 géneros de plantas vasculares, que representan aproximadamente 1400 especies vegetales, pueden ser infectados por alguna de las 28 especies del género *Botrytis spp*. (Elad, et al 2007).

Botrytis cinerea es uno de los patógenos fúngicos necrotróficos más estudiados y causa la pudrición gris en más de 500 especies de plantas (Williamson et al., 2007). Este patógeno tiene un impacto económico devastador en diversos cultivos de importancia,

incluyendo uva, fresa y tomate (Dean et al., 2012), y puede estar presente en tallos, hojas, flores, frutos y semillas. Puede provocar síntomas evidentes de la enfermedad en el periodo de pre-cosecha o permanecer en estado latente hasta el periodo de postcosecha (Fillinger y Elad, et al 2016).

La enfermedad es particularmente difícil de manejar debido a su rápida propagación bajo condiciones favorables, como alta humedad y temperaturas moderadas (Latorre, et al 2015, Ali Sarayreh et al 2020) *Botrytis cinerea* puede infectar los cultivos tanto en campo como durante el almacenamiento poscosecha (Romanazzi et, al 2016) , lo que lo convierte en una amenaza persistente a lo largo de toda la cadena de producción agrícola. Además, la capacidad del patógeno para desarrollar resistencia a fungicidas de uso común ha agravado el problema (Leroux et al 2002, lo que hace necesario explorar estrategias alternativas de detección y manejo.

Botrytis cinerea debido a su amplio rango de hospedantes, diversos modos de ataque y la presencia de fases tanto asexuales como sexuales que le permiten sobrevivir en condiciones favorables o desfavorables (Fillinger y Elad, 2016). Las esporas asexuales de este hongo son los conidios, que se dispersan fácilmente por el viento o el agua, mientras que sus estructuras sexuales son los esclerocios, fundamentales para su supervivencia en ambientes adversos (Brandhoff et al., 2017).

La detección temprana y precisa de *Botrytis cinerea* es esencial para implementar estrategias de manejo efectivas, reducir el daño en los cultivos y disminuir la dependencia de productos químicos.

4.2. Materiales y métodos

Los ensayos realizados en *Botrytis spp.* se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones experimentales descritas para *Sclerotium cepivorum* (Capítulo 2). Las únicas variaciones correspondieron a las condiciones específicas de crecimiento de cada patógeno, particularmente en el tiempo de incubación y desarrollo micelial.

4.3 Resultados

4.3.1 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra *Botrytis spp*

Los resultados del análisis *In vitro* de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol sobre el crecimiento micelial de *Botrytis spp.* mostraron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración (Cuadro 6).

Como se observa en el cuadro 6, las concentraciones de 100, 90 y 70 ppm lograron una inhibición del 100%, evidenciando una alta eficacia de la molécula a concentraciones elevadas.

A partir de 50 ppm, la inhibición disminuyó, registrándose un promedio de 73.42%, seguido de 62.24% a 30 ppm. En concentraciones menores, como 10 ppm, la inhibición fue de 57.08%, mientras que a 5 ppm se obtuvo el valor más bajo con 28.89%. En la figura 11 podemos observar el efecto de inhibición micelial de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra el hongo *Botrytis spp.*

Cuadro 8: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración

Concentración	Porcentaje de inhibición (Primera rep)	Porcentaje de inhibición (Segunda rep)	Porcentaje de inhibición (Tercera rep)	Promedio
100 ppm	100	100	100	100.00
90 ppm	100	100	100	100.00
70 ppm	100	100	100	100.00
50 ppm	79.52	64.07	76.67	73.42
30 ppm	64.62	57.43	64.66	62.24
10 ppm	58.78	55.67	56.78	57.08
5 ppm	29.67	26.89	30.1	28.89

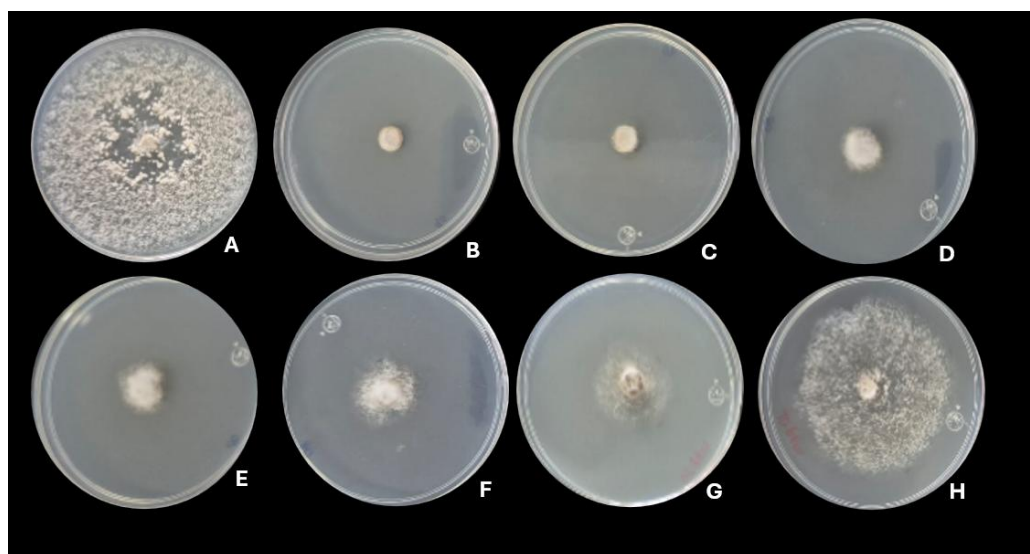


Figura 12: Crecimiento micelial de *Botrytis spp*, en cajas Petri bajo diferentes concentraciones del tratamiento de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol donde A: Testigo, B: 100 ppm, C:90 ppm, D: 70 ppm, E:50 ppm, F:30 ppm, G:10 ppm y H:5 ppm

Se aplicaron dos pruebas no paramétricas: Kruskal–Wallis para diferencias globales entre concentraciones y Jonckheere–Terpstra para evaluar una tendencia ordenada creciente.

Cuadro 9: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración

Prueba	n	Estadístico	gl	p	Conclusión
Kruskal–Wallis	21	H = 19.32	6	.004	Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas.
Jonckheere–Terpstra	21	J = 172.50	—	< .001	Se observó una tendencia creciente significativa del porcentaje de inhibición al aumentar la concentración.

Nota. Se analizaron siete concentraciones con tres réplicas por grupo (n total = 21). Para Jonckheere–Terpstra se asumió una alternativa creciente, coherente con la hipótesis de respuesta dosis–dependiente.

4.3.2 Gráficos representativos

A continuación, se incluyen los gráficos elaborados para mostrar la distribución de los datos, la tendencia dosis–respuesta y la estimación del IC₅₀.

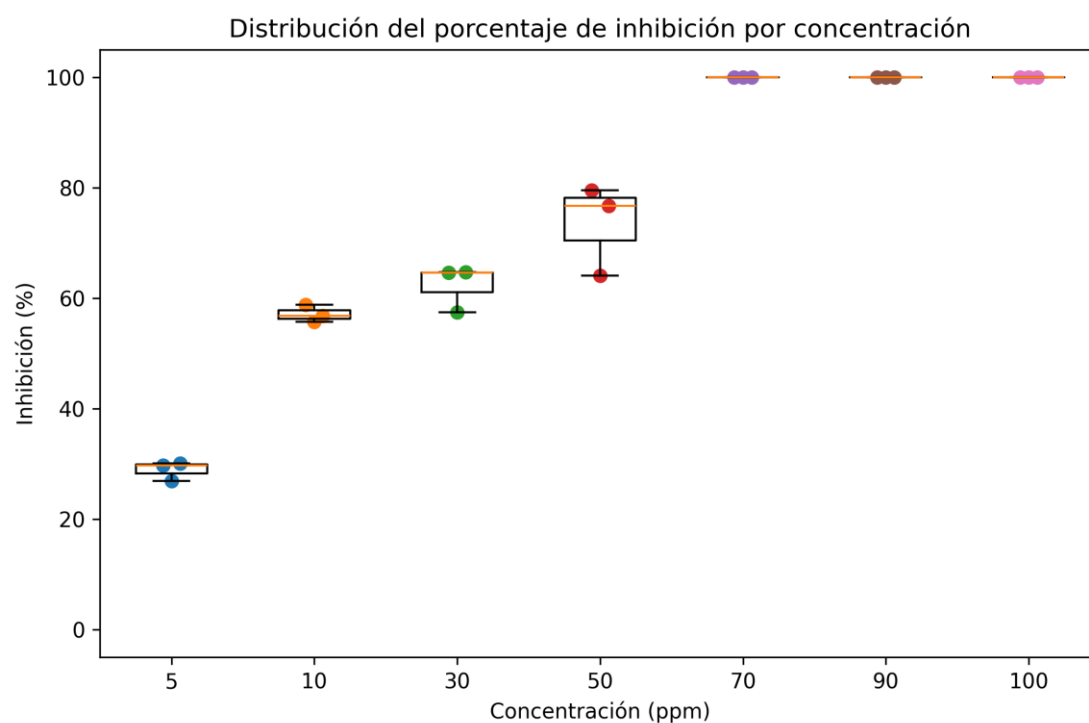


Figura 13. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración de la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol contra *Botrytis spp*

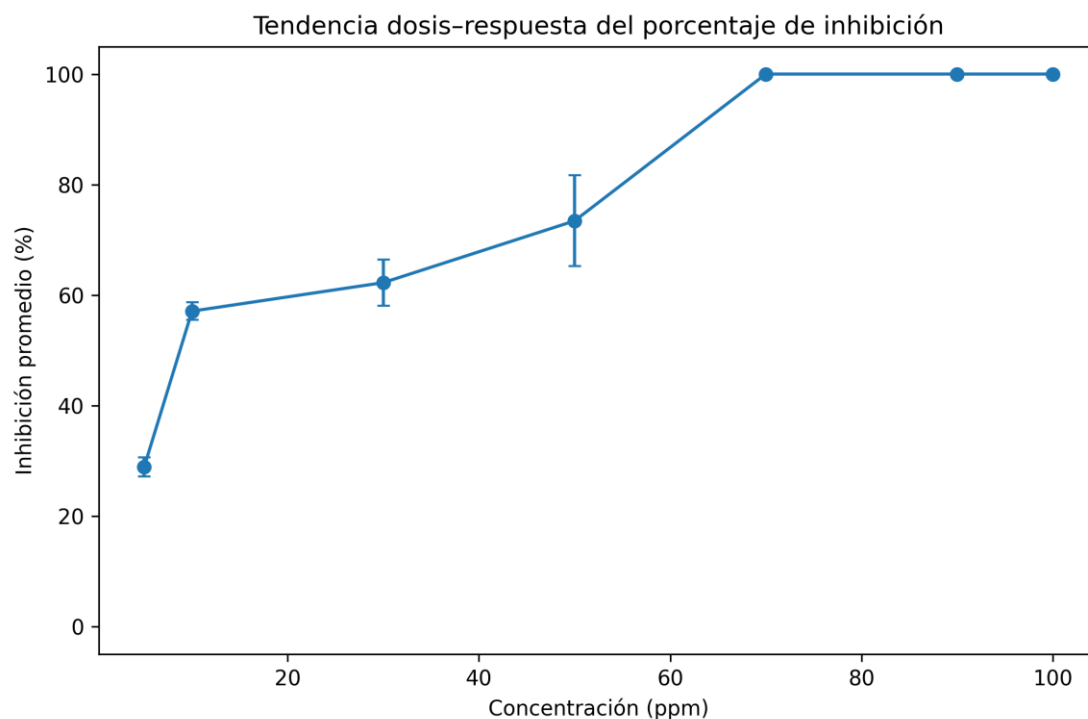


Figura 14. Tendencia dosis-respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración de la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol contra *Botrytis spp.*

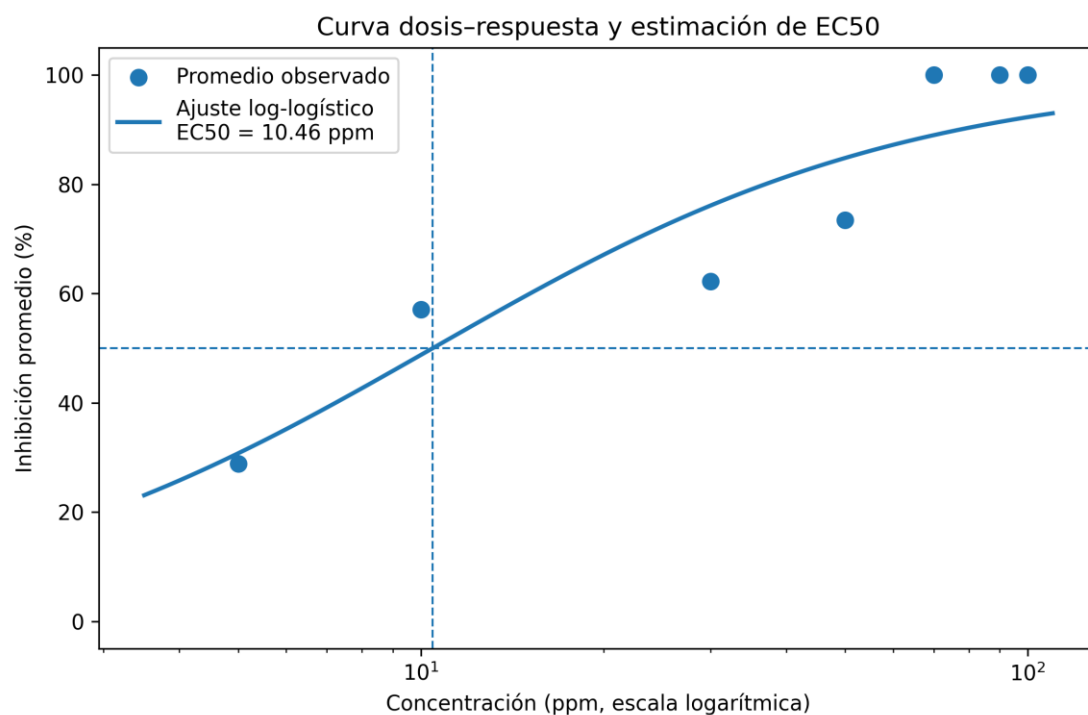


Figura 15. Curva dosis-respuesta en escala logarítmica, a partir de datos experimentales de inhibición micelial de *Botrytis spp* tratados con la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol con estimación de IC₅₀ de 10.46 ppm.

La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas, $H(6) = 19.32$, $p = .004$. Además, la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia creciente significativa en el porcentaje de inhibición a medida que aumentó la concentración de la molécula sola, $J = 172.50$, $p < .001$. El modelo log-logístico de dosis–respuesta estimó un IC_{50} de 10.46 ppm, ubicado entre las concentraciones de 5 y 10 ppm. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa la molécula sola mostró un efecto inhibitorio significativo y dependiente de la concentración contra *Botrytis*.

Los datos muestran un patrón consistente de respuesta dosis–dependiente: la inhibición fue baja a 5 ppm, aumentó a 10, 30 y 50 ppm, y alcanzó 100% en las concentraciones de 70 ppm o superiores. Este comportamiento respalda la actividad inhibitoria de la molécula sola contra el hongo evaluado.

4.4 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Tebuconazol contra *Botrytis spp*

Los resultados del análisis *In vitro* de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol en combinación con tebuconazol sobre el crecimiento micelial de *Botrytis spp*. mostraron un efecto antifúngico dependiente de la concentración (Cuadro 10).

Cuadro 10: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis spp*. por efecto de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol en combinación con tebuconazol bajo condiciones *In vitro*

Concentración	Porcentaje de inhibición (Primera rep)	Porcentaje de inhibición (Segunda rep)	Porcentaje de inhibición (Tercera rep)	Promedio
100 ppm	100	100	100	100.00
90 ppm	100	100	100	100.00
70 ppm	100	100	100	100.00
50 ppm	82.76	84.1	80.89	82.58
30 ppm	69.22	77.71	75.45	74.13
10 ppm	61.89	66.65	64.87	64.47
5 ppm	24.89	43.97	34.89	34.58

Como se observa en el cuadro 10, las concentraciones de 100, 90 y 70 ppm presentaron una inhibición del 100%, indicando una alta eficacia del tratamiento combinado a concentraciones elevadas.

A partir de 50 ppm, la inhibición disminuyó ligeramente, registrándose un promedio de 82.58%, seguido de 74.13% a 30 ppm. En concentraciones menores, como 10 ppm, se obtuvo una inhibición de 64.47%, mientras que a 5 ppm se registró el valor más bajo con 34.58%.

En general, los resultados indican que la combinación de la molécula con tebuconazol mantiene una alta actividad antifúngica a concentraciones altas e intermedias, aunque su eficacia disminuye progresivamente a medida que se reduce la concentración, lo que sugiere una relación directa entre la dosis aplicada y el nivel de inhibición del patógeno, en la figura 12 podemos observar el crecimiento micelial del hongo *Botrytis spp* junto con la mezcla realizada de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol en sinergia con Tebuconazol.

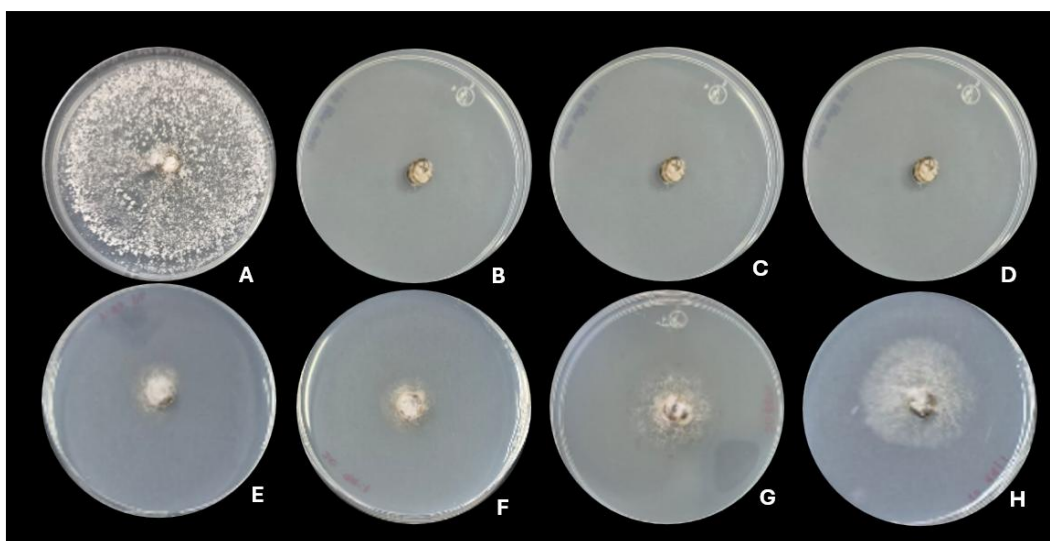


Figura 16: Crecimiento micelial de *Botrytis spp* en cajas Petri donde A=Testigo, B=9.9 mg ARP + 0.1 mg t, C= 8.91 mg ARP + 0.09 mg t, D=6.93 mg ARP + 0.07 mg t, E= 4.95 mg ARP+ 0.05 mg t F=2.97 mg ARP + 0.03 mg t G=0.99 mg ARP + 0.01 mg t H=0.48 donde ARP= 3 tienil 5 azido pirazol y t= tebuconazol.

Se aplicaron dos pruebas no paramétricas: Kruskal–Wallis para evaluar diferencias globales entre concentraciones y Jonckheere–Terpstra para evaluar una tendencia ordenada creciente.

Cuadro 11: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración

Prueba	n	Estadístico	gl	p	Conclusión
Kruskal–Wallis	21	H = 19.77	6	.003	Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas.
Jonckheere–Terpstra	21	J = 175.50	—	< .001	Se observó una tendencia creciente significativa del porcentaje de inhibición al aumentar la concentración.

Nota. Se analizaron siete concentraciones con tres réplicas por grupo (n total = 21). Para Jonckheere–Terpstra se asumió una alternativa creciente, coherente con la hipótesis de respuesta dosis–dependiente.

4.4.1 Gráficos representativos

A continuación, se incluyen los gráficos elaborados para mostrar la distribución de los datos, la tendencia dosis–respuesta y la curva ajustada empleada para la estimación del IC₅₀.

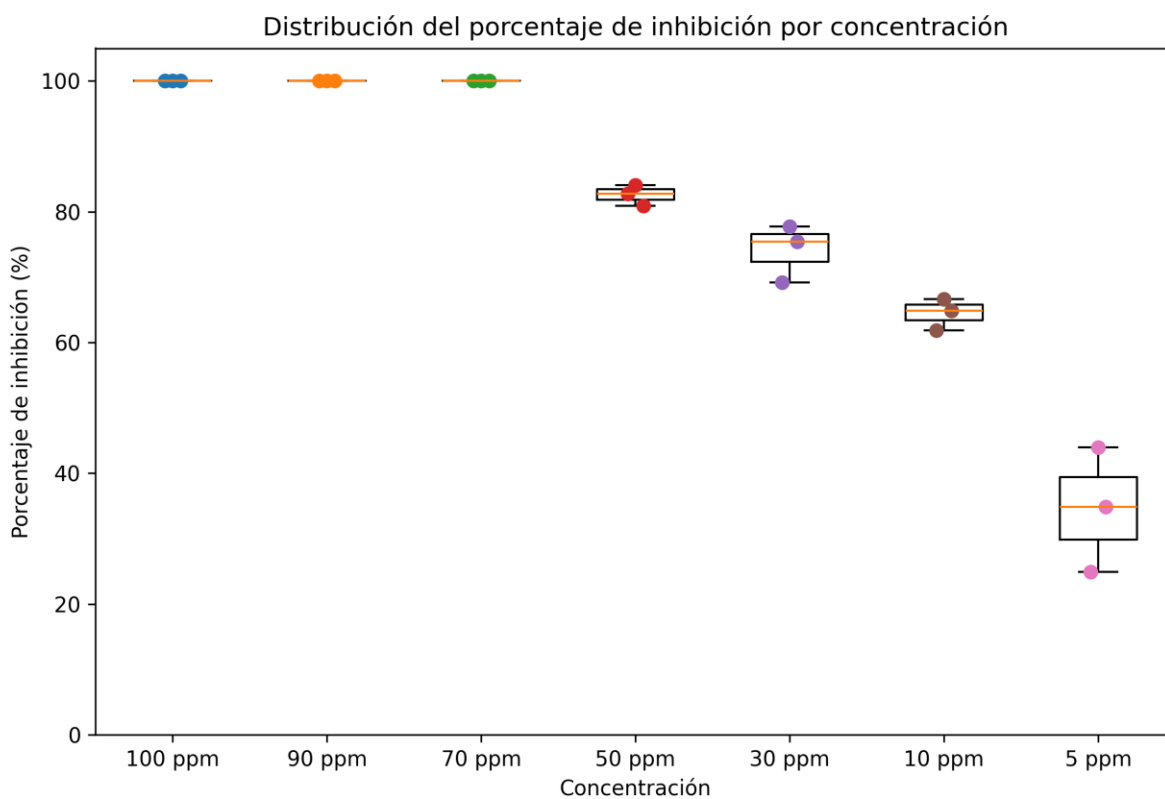


Figura 17. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol mas tebuconazol contra *Botrytis spp.*

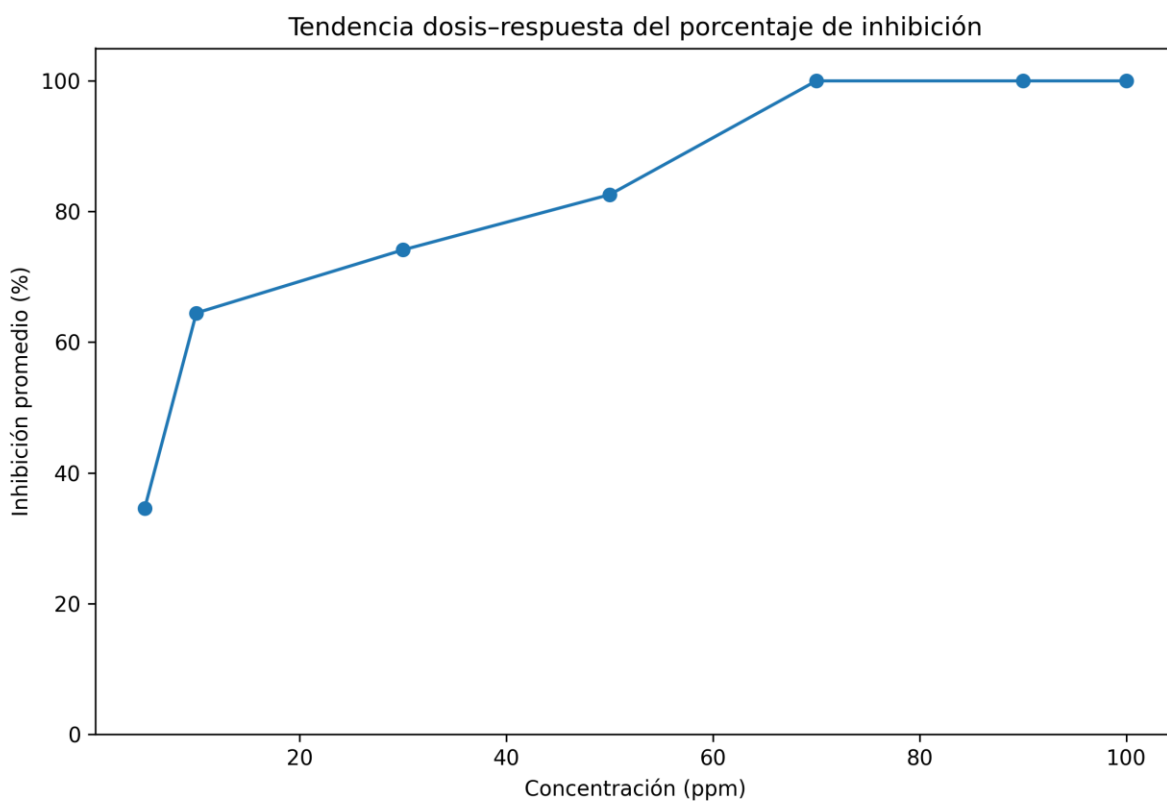


Figura 18. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol más tebuconazol contra *Botrytis spp.*

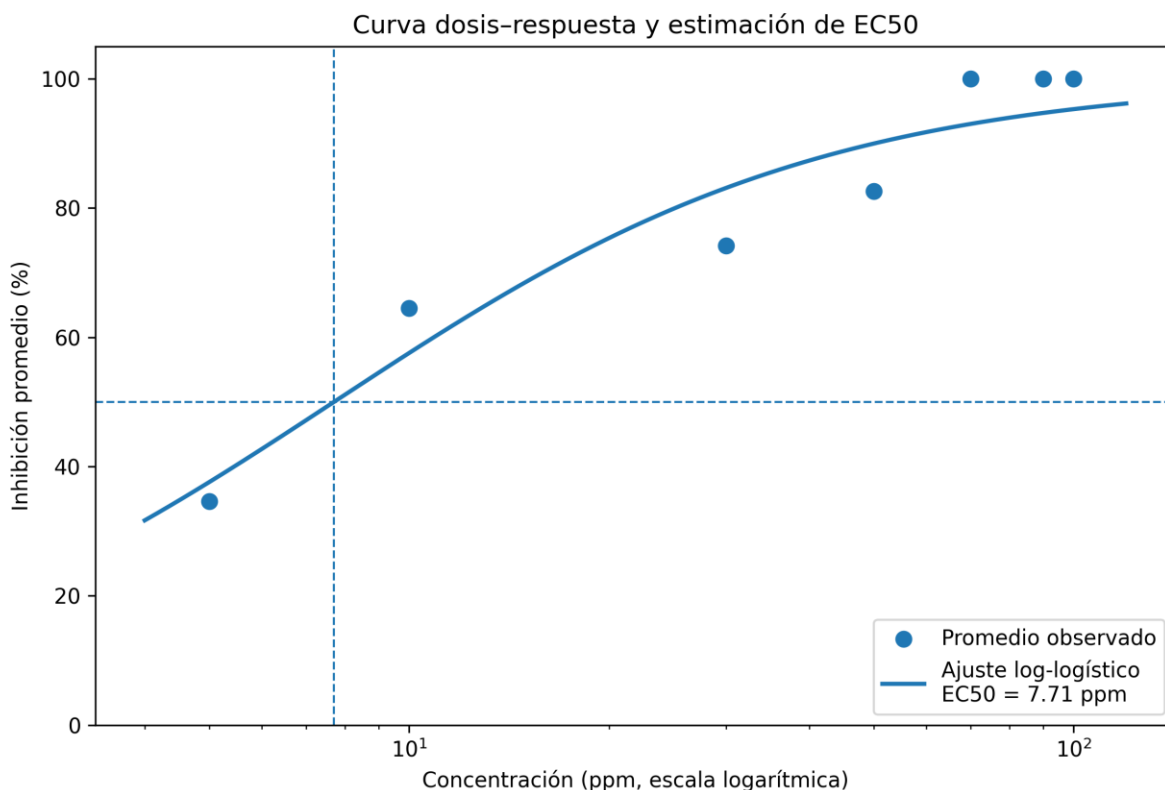


Figura 19. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica a partir de datos experimentales de inhibición micelial de *Botrytis spp* tratados con la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol con tebuconazol con una estimación de IC_{50} (7.71 ppm).

La prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia creciente significativa en el porcentaje de inhibición a medida que aumentó la concentración, $J = 175.50$, $p < .001$. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, la combinación de 3-tienil-5-azido pirazol con tebuconazol mostró un efecto inhibitorio creciente y marcado sobre *Botrytis* conforme aumentó la concentración. El ajuste de la curva dosis–respuesta estimó un IC_{50} de 7.71 ppm, lo que indica que dicha concentración produce aproximadamente 50% de inhibición del crecimiento. Este comportamiento refuerza la interpretación de un efecto fuerte y sostenido de la combinación sobre el crecimiento del hongo.

4.5 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Nanopartículas de plata contra *Botrytis spp*

La evaluación *In vitro* de la combinación de 3-tienil-5-azido pirazol con nanopartículas de plata evidenció una respuesta variable en la inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis spp.*, en función de la concentración aplicada (Cuadro 12).

A una concentración de 50 ppm, se alcanzó una inhibición promedio de 71.81%, lo que refleja una actividad antifúngica moderada. Al disminuir la dosis a 10 ppm, el efecto inhibitorio se redujo ligeramente, registrándose un 61.33%.

La tendencia decreciente se acentuó en concentraciones más bajas; a 5 ppm, la inhibición fue de 31.29%, indicando una pérdida importante de eficacia. En contraste, las concentraciones de 2.5 y 1 ppm no mostraron efecto inhibitorio sobre el patógeno, en la figura 13 se observa el efecto inhibitorio de molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con nanopartículas de plata.

Cuadro 12: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis spp.* por efecto de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol en combinación con nanopartículas de plata bajo condiciones *In vitro*.

Concentración	Porcentaje de inhibición	Porcentaje de inhibición	Promedio
50 ppm	73.16	70.45	71.81
10 ppm	61.76	60.89	61.33
5 ppm	29.87	32.7	31.29
2.5 ppm	0	0	0.00
1 ppm	0	0	0.00

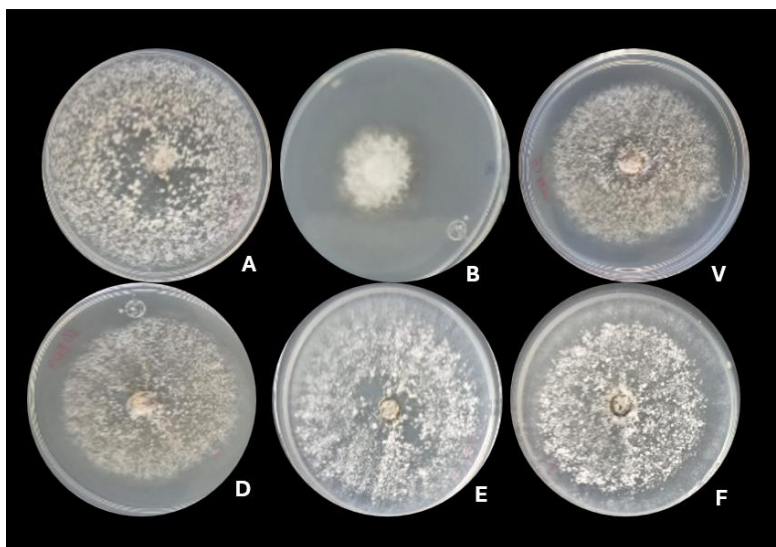


Figura 20 : Crecimiento micelial de *Botrytis spp* en cajas Petri donde A=Testigo, B=6.93 mg ARP + 2.5 ml Ag C=0.99 mg ARP + 0.5 ml Ag, D=0.48 mg ARP + 0.25 ml Ag, E=0.24 mg ARP + 0.175 ml Ag, G=0.09 mg ARP + 0.05 ml Ag, donde ARP= 3 tienil 5 azido pirazol y Ag= Nanopartículas de plata.

Se aplicaron dos pruebas no paramétricas: Kruskal–Wallis para evaluar diferencias globales entre concentraciones y Jonckheere–Terpstra para evaluar una tendencia ordenada creciente.

Cuadro 13: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración

Prueba	n	Estadístico	gl	p	Conclusión
Kruskal–Wallis	24	H = 22.84	7	.002	Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas.
Jonckheere–Terpstra	24	J = 207.00	—	< .001	Se observó una tendencia creciente significativa del

porcentaje de
inhibición al
aumentar la
concentración.

Nota. Se analizaron ocho concentraciones con tres réplicas por grupo (n total = 24). Para Jonckheere–Terpstra se asumió una alternativa creciente, coherente con la hipótesis de respuesta dosis–dependiente.

4.5.1 Gráficos representativos

A continuación, se incluyen los gráficos elaborados para mostrar la distribución de los datos, la tendencia dosis–respuesta y la curva ajustada empleada para la estimación del IC₅₀.

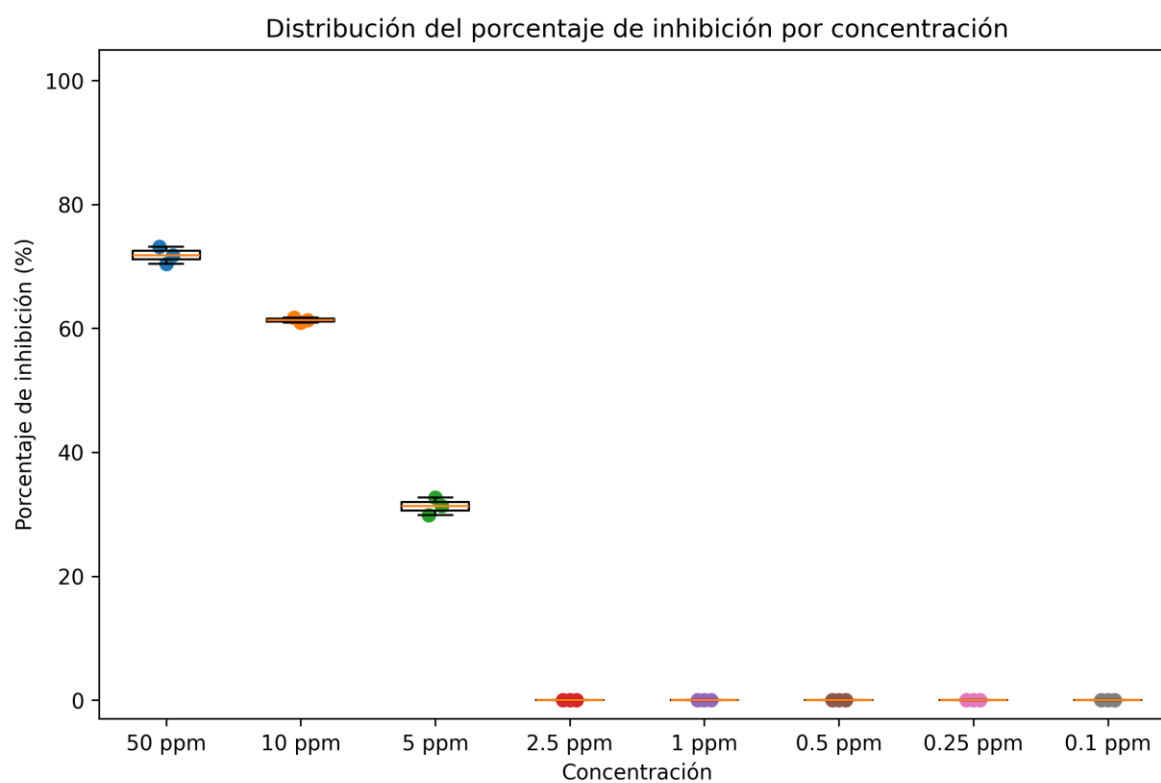


Figura 21. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración de molécula 3 tienil 5 azido pirazol más nanopartículas de plata conta *Botrytis spp.*

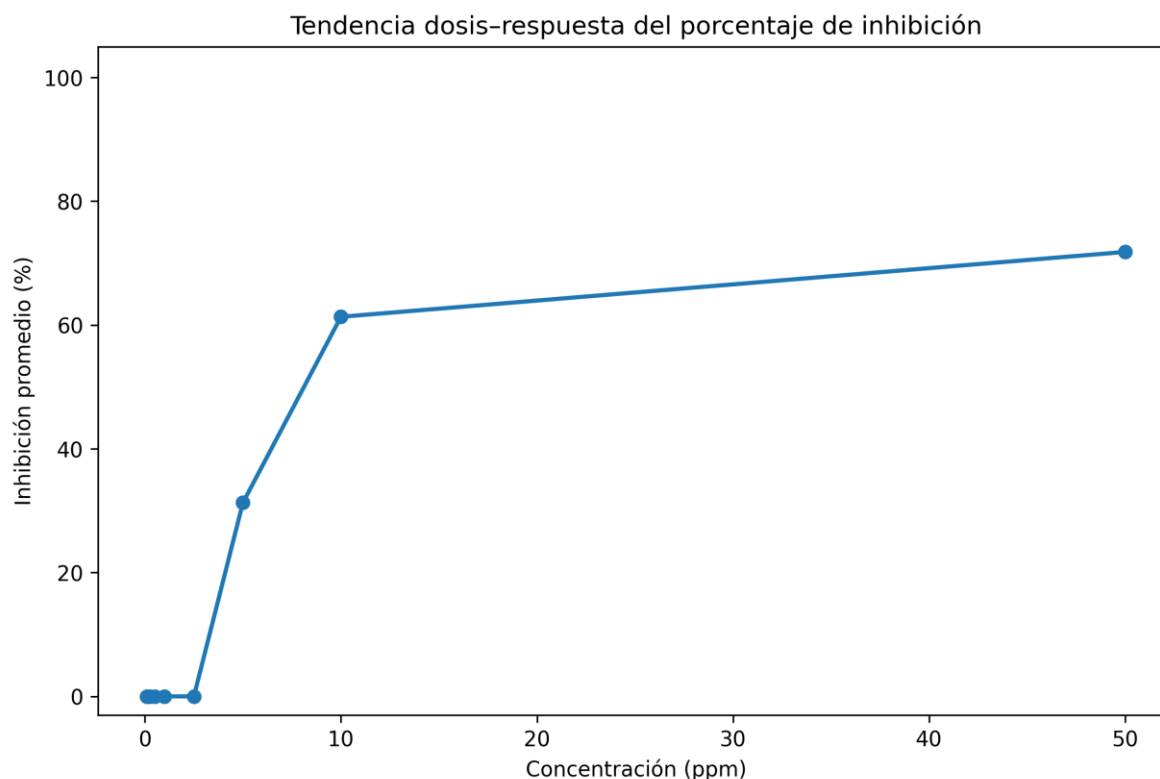


Figura 22: Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración molécula 3 tienil 5 azido pirazol más nanopartículas de plata contra *Botrytis spp.*

Para obtener el IC_{50} se ajustó un modelo log-logístico con límite inferior en 0 y límite superior estimado, debido a que la inhibición máxima observada fue de 71.81% y no alcanzó 100% dentro del rango experimental. El modelo estimó un límite superior aproximado de 70.27% y una pendiente de 3.69. La concentración asociada con 50% de inhibición absoluta fue $IC_{50} = 6.95$ ppm (Figura 19).

Este valor debe interpretarse como una estimación basada en la curva ajustada. A diferencia de los tratamientos que alcanzan 100% de inhibición, aquí la respuesta máxima observada fue menor, por lo que el ajuste considera una meseta inferior al 100%.

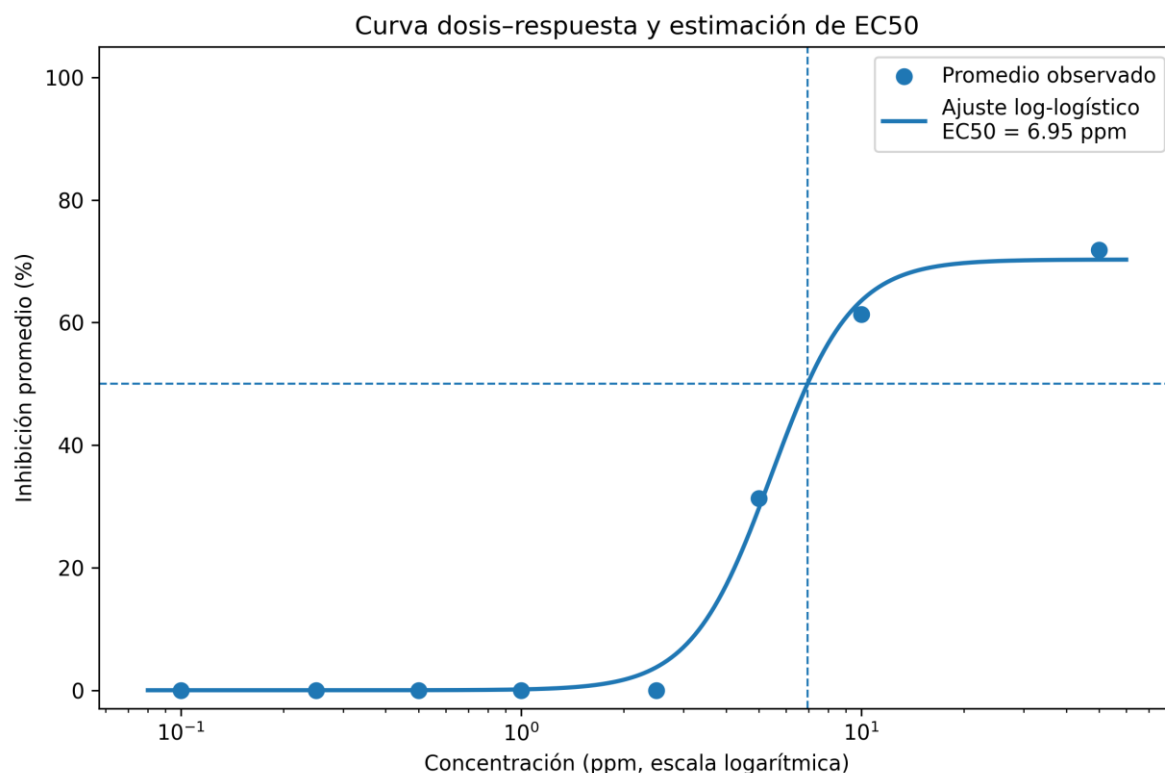


Figura 23: Curva dosis–respuesta en escala logarítmica a partir de datos experimentales de inhibición micelial de *Botrytis spp* tratados con la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol con nanopartículas de plata con una estimación de IC_{50} (6.95 ppm).

4.6 Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la molécula 3-tienil-5-azido pirazol presenta actividad antifúngica contra *Botrytis spp.*, evidenciando una respuesta dependiente de la concentración. Este comportamiento confirma que el compuesto no actúa de manera específica sobre un solo patógeno, sino que posee un efecto biológico más amplio, lo cual es consistente con el potencial reportado para derivados del núcleo pirazol que han sido aprobados para la protección de las plantas y ayudan a proteger diversos cultivos de un amplio espectro de hongos fitopatógenos al interrumpir el ciclo energético del hongo (Sauter, et al 1999). A diferencia de lo observado en *Sclerotium cepivorum* (Capítulo II), donde se alcanzó una inhibición completa a concentraciones intermedias, en *Botrytis spp.* la respuesta puede ser menos marcada o requerir mayores concentraciones para alcanzar niveles equivalentes de inhibición. Esta diferencia puede explicarse por la biología del patógeno, ya que *Botrytis spp.* es un patógeno necrotrófico y polífago que tiene una notable capacidad para infectar una amplia gama de especies

vegetales (Derbyshire et al. 2022). Este patógeno es altamente exitoso debido a su elevada capacidad reproductiva, mecanismos de supervivencia notables y estrategias de infección multifacéticas. Esta combinación de características contribuye a su distribución global, situándolo entre los 10 fitopatógenos más devastadores económicamente (Dean et al., 2012).

El efecto observado en la combinación con tebuconazol sugiere una interacción positiva entre ambos compuestos, ya que se incrementa la eficacia antifúngica en comparación con la molécula sola. Este resultado es consistente con el comportamiento descrito en el capítulo anterior, pero en este caso adquiere mayor relevancia debido a la dificultad inherente en el control de *Botrytis spp.*, particularmente por su capacidad de desarrollar resistencia a fungicidas del grupo de los triazoles. En este contexto, el uso combinado de moléculas con diferentes mecanismos de acción representa una estrategia viable para mejorar la eficacia del control y reducir la presión de selección (Hahn, 2014).

Desde el punto de vista estadístico, la presencia de diferencias significativas entre concentraciones y una tendencia creciente en la inhibición confirman que la respuesta del patógeno está directamente relacionada con la dosis aplicada. Este patrón refuerza la validez del modelo dosis–respuesta y respalda la hipótesis planteada en el estudio.

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que, aunque la molécula 3-tienil-5-azido pirazol es efectiva contra *Botrytis spp.*, su eficacia es modulada por las características biológicas del patógeno, lo que resalta la importancia de considerar el tipo de hongo en la evaluación de nuevos compuestos antifúngicos.

4.7 Conclusión

La molécula 3-tienil-5-azido pirazol presentó actividad antifúngica contra *Botrytis spp.* en condiciones *In vitro*, mostrando un comportamiento dependiente de la concentración.

Al combinarse con tebuconazol, la eficacia del tratamiento aumentó significativamente, lo que sugiere un efecto complementario entre ambos compuestos. Las concentraciones de 100, 90 y 70 ppm presentaron una inhibición del 100 % del crecimiento micelial de *Botrytis spp.*. A 50 ppm se obtuvo un promedio de inhibición de 82.58 %, mientras que a

30 y 10 ppm los valores fueron de 74.13 % y 64.47 %, respectivamente. La concentración de 5 ppm registró una inhibición de 34.58 %. Por otro lado, la combinación con nanopartículas de plata mostró una actividad antifúngica moderada y dependiente de la concentración, alcanzando un promedio de inhibición de 71.81 % a 50 ppm, 61.33 % a 10 ppm y 31.29 % a 5 ppm, mientras que las concentraciones de 2.5 y 1 ppm no mostraron inhibición del crecimiento micelial.

Los análisis estadísticos realizados confirmaron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas ($p < 0.05$), observándose una tendencia creciente en el porcentaje de inhibición conforme aumentó la concentración de los tratamientos. La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas entre tratamientos ($H = 19.32$; $p = .004$), mientras que la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia dosis–respuesta significativa ($J = 172.50$; $p < .001$). Además, el modelo log-logístico estimó un IC_{50} de 10.46 ppm para la molécula sola y un EC_{50} de 7.71 ppm para la combinación con tebuconazol, evidenciando una mayor eficacia del tratamiento combinado. Estos resultados permitieron rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa, confirmando la actividad antifúngica de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol contra *Botrytis spp.*

En conclusión, la molécula evaluada presenta potencial como agente antifúngico de amplio espectro; sin embargo, su eficacia depende de la biología del patógeno, por lo que su aplicación debe considerarse dentro de estrategias integradas de manejo de enfermedades.

Literatura citada

- Al-Sarayreh, M.; Reis, M.M.; Yan, W.Q.; Klette, R. Potential of deep learning and snapshot hyperspectral imaging for classification of species in meat. *Food Control* 2020, 117, 107332.
- Bi, K.; Liang, Y.; Mengiste, T.; Sharon, A. Killing softly: A roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends Plant Sci.* 2022, 28, 211–222.

- Choquer, M.; Fournier, E.; Kunz, C.; Levis, C.; Pradier, J.M.; Simon, A.; Viaud, M. Botrytis cinerea virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. FEMS Microbiol. Lett. 2007, 277, 1–10.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D. et al. (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 13, 414–430.
- Derbyshire, M.C., Newman, T.E., Khentry, Y. & Owolabi Taiwo, A. (2022) The evolutionary and molecular features of the broad-host-range plant pathogen Sclerotinia sclerotiorum. Molecular Plant Pathology, 23, 1075–1090.
- Elad, Y.; Stewart, A. Microbial control of Botrytis spp. In Botrytis: Biology, Pathology and Control; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 223–241. [CrossRef]
- Fillinger, S. & Elad, Y. (2016) Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. Switzerland: Springer.
- Latorre, B.A.; Elfar, K.; Ferrada, E.E. Gray mold caused by Botrytis cinerea limits grape production in Chile. Cienc. Investig. Agrar. 2015, 42, 305–330.
- Leroux, P.; Fritz, R.; Debieu, D.; Albertini, C.; Lanen, C.; Bach, J.; Gredt, M.; Chapeland, F. Mechanisms of resistance to fungicides Biol. Technol. 2016, 113, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.posth>
- Romanazzi, G.; Smilanick, J.L.; Feliziani, E.; Droby, S. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. Postharvest Biol. Technol. 2016, 113, 69–76.
- Sauter, H.; Steglich, W.; Anke, T. Strobilurins: Evolution of a New Class of Active Substances. Angew. Chem. Int. Ed. 1999, 38, 1328–1349.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. & Van Kan, J.A.L. (2007) Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology, 8, 561–580.

CAPITULO 5 ESTUDIOS *IN VITRO* DE 3 TIENIL 5 AZIDO PIRAZOL SOLA Y EN COMBINACION CON NANOPATILUAS DE PLATA Y TEBUCONAZOL CONTRA *Fusarium sp*

Resumen

En este capítulo se evaluó la actividad antifúngica de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol contra *Fusarium spp.* en condiciones *In vitro*, tanto de forma individual como en combinación con tebuconazol y nanopartículas de plata.

Los resultados mostraron un efecto dependiente de la concentración, alcanzando inhibiciones del 100% en concentraciones altas. En comparación con otros patógenos evaluados, *Fusarium spp.* presentó una respuesta más variable, atribuida a su capacidad de adaptación y supervivencia en el suelo. La combinación con tebuconazol incrementó la eficacia antifúngica, registrando inhibiciones del 100 % en 100, 90 y 70 ppm; 74.32 % a 50 ppm; 65.32 % a 30 ppm; 51.62 % a 10 ppm y 46.41 % a 5 ppm, con un EC₅₀ de 8.70 ppm. Por otro lado, la combinación con nanopartículas de plata presentó inhibiciones de 69.81 % a 50 ppm, 44.58 % a 10 ppm y 22.67 % a 5 ppm, mientras que a 1 y 2.5 ppm no se observó inhibición del crecimiento micelial. El EC₅₀ estimado para esta combinación fue de 17.37 ppm.

5.1 Introducción

El género *Fusarium spp.* fue descrito por primera vez en 1809 por Heinrich Friedrich Link y posteriormente incluido en la taxonomía por Elias Magnus Fries en 1821.

Hasta la fecha, se conocen aproximadamente 300 especies de *Fusarium*, aunque casi la mitad de ellas no han sido descritas oficialmente (Abdel-Azeem et al, 2019, Aoki et al 2014, Cobo-Diaz et al 2019, Summerell et al 2019).

Fusarium spp es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas (Tapia et al, 2014).

Aunque la mayoría de las especies de *Fusarium* son microorganismos del suelo inofensivos, un pequeño número de especies patógenas de *Fusarium spp.* representan una amenaza significativa para la agricultura (Munkvold et al 2017, Ma L et al 2013, Munkvold et al, 2017, Zakaria, et al 2022).

Estas especies patógenas son capaces de infectar una amplia variedad de plantas, incluyendo cultivos alimentarios y comerciales, plantas medicinales y ornamentales (Kuhnem et al, 2016, Duan et al 2016, Nganje et al 2004).. La infección causada por *Fusarium* conduce a diferentes tipos de pudriciones, como pudrición de raíz, tallo, base, flores y espigas, al atacar y destruir el sistema vascular de la planta (Ma L et al 2013, Waller et al 1990, Rampersad et al 2020).

Las especies de *Fusarium spp.* se adaptan a una amplia variedad de hábitats y, aunque presentan afinidad por climas templados, son capaces de contaminar cultivos a nivel mundial (Ekwomadu et al, 2019).

Fusarium spp. es uno de los principales hongos fitopatógenos del suelo, responsable de numerosas enfermedades de importancia económica en cultivos. Además de su capacidad patogénica, una de sus características más peligrosas es la producción de metabolitos secundarios tóxicos (micotoxinas) . Entre las toxinas más importantes y frecuentes producidas por *Fusarium* se encuentran los tricotecenos, fumonisinas y zearalenona ((Ekwomadu et al, 2019).

Muchas especies de *Fusarium* son patógenas de cultivos importantes; entre ellas, *Fusarium graminearum* y *Fusarium oxysporum* se encuentran dentro de los diez patógenos fúngicos más importantes en fitopatología (Dean et al 2012).

Las pérdidas económicas globales en la agricultura asociadas con cepas fitopatógenas de *Fusarium* alcanzan miles de millones de dólares al año (Bakker et al 2018). La prevalencia de infecciones por *Fusarium* en plantas puede evidenciarse en que especies como *Fusarium graminearum* y *Fusarium oxysporum* se encuentran entre los principales patógenos fúngicos de las plantas.

Además, *Fusarium* ha sido incluido recientemente entre los diez hongos fitopatógenos de mayor importancia económica (Timmusk et al 2020).

A pesar del desarrollo de nuevos fungicidas, estos hongos presentan un alto potencial adaptativo, lo que les permite infectar eficazmente a las plantas cultivadas (Rampersad et al 2021).

Por ello, es fundamental continuar investigando nuevas alternativas de control, incluyendo enfoques biológicos, compuestos bioactivos y tecnologías emergentes como las nanopartículas, con el fin de desarrollar estrategias más eficaces y sostenibles para su manejo en sistemas agrícolas.

5.2 Materiales y métodos

Los ensayos realizados en *Fusarium spp.* se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones experimentales descritas para *Sclerotium cepivorum* (Capítulo 2). Las únicas variaciones correspondieron a las condiciones específicas de crecimiento de cada patógeno, particularmente en el tiempo de incubación y desarrollo micelial.

5.3. Resultados

5.3.1 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra *Fusarium spp*

La actividad antifúngica de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol frente a *Fusarium spp.* evaluada *In vitro* mostró una disminución progresiva en la inhibición del crecimiento micelial conforme se redujo la concentración del tratamiento (Cuadro 14).

Las concentraciones de 100 y 90 ppm lograron una inhibición total (100%), mientras que a 70 ppm aún se observó un efecto elevado, con un promedio de 80.69%. Sin embargo, al disminuir la concentración a 50 ppm, la inhibición descendió a 69.66%, continuando esta tendencia a 30 ppm con un 55.18%.

En concentraciones bajas, el efecto antifúngico fue considerablemente menor. A 10 ppm, la inhibición promedio fue de 14.09%, y a 5 ppm se registró un valor de 11.66%, indicando una pérdida significativa de la actividad de la molécula. En la figura 23 se puede observar el efecto fungistático de la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol.

Cuadro 14: Efecto antifúngico de la combinación de 3-tienil-5-azido pirazol sobre el crecimiento micelial de *Fusarium spp* en condiciones *In vitro*.

Concentración	Porcentaje de inhibición (Primera rep)	Porcentaje de inhibición (Segunda rep)	Porcentaje de inhibición (Tercera rep)	Promedio
100 ppm	100	100	100	100
90 ppm	100	100	100	100
70 ppm	84.81	76.57	73.25	80.69
50 ppm	71.55	67.78	65.25	69.665
30 ppm	67.56	42.8	45.25	55.18
10 ppm	12.21	15.97	19.23	14.09
5 ppm	10.6	12.73	15.25	11.665

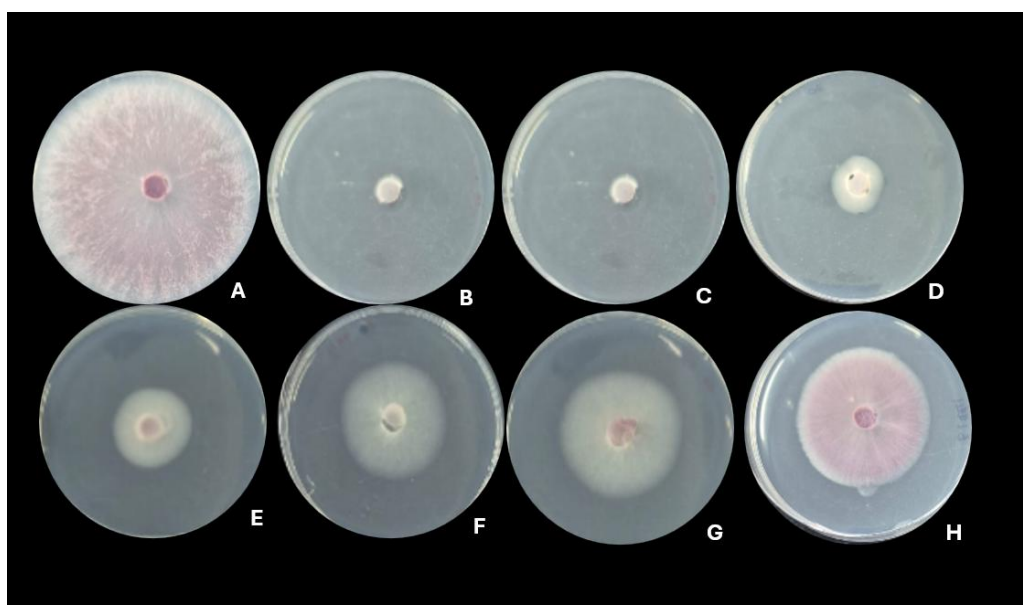


Figura 24: Crecimiento micelial de *Fusarium spp* en cajas Petri bajo diferentes concentraciones del tratamiento de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol, donde **A:**Testigo, **B:**100 ppm, **C:**90 ppm, **D:** 70 ppm, **E:**50 ppm, **F:** 30 ppm, **G:** 10 ppm y **H:**10 ppm

Se aplicaron dos pruebas no paramétricas: Kruskal–Wallis para evaluar diferencias globales entre concentraciones y Jonckheere–Terpstra para evaluar una tendencia ordenada creciente.

Cuadro 15: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración

Prueba	n	Estadístico	gl	p	Conclusión
Kruskal–Wallis	21	H = 19.34	6	.004	Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas.
Jonckheere–Terpstra	21	J = 181.50	—	< .001	Se observó una tendencia creciente significativa del porcentaje de inhibición al aumentar la concentración.

Nota. Se analizaron siete concentraciones con tres réplicas por grupo (n total = 21). Para Jonckheere–Terpstra se asumió una alternativa creciente, coherente con la hipótesis de respuesta dosis–dependiente.

Se ajustó un modelo log-logístico de dos parámetros para estimar la concentración efectiva media (IC_{50}), entendida como la concentración necesaria para producir 50% de inhibición. El modelo estimó un IC_{50} de 27.55 ppm y una pendiente de 1.77. Este valor se encuentra dentro del intervalo experimental evaluado y cercano a la concentración de 30 ppm, donde se observó una inhibición promedio de 51.87%.

5.3.2 Gráficos representativos

A continuación, se incluyen los gráficos elaborados para mostrar la distribución de los datos, la tendencia dosis–respuesta y la curva ajustada empleada para la estimación del IC_{50} .

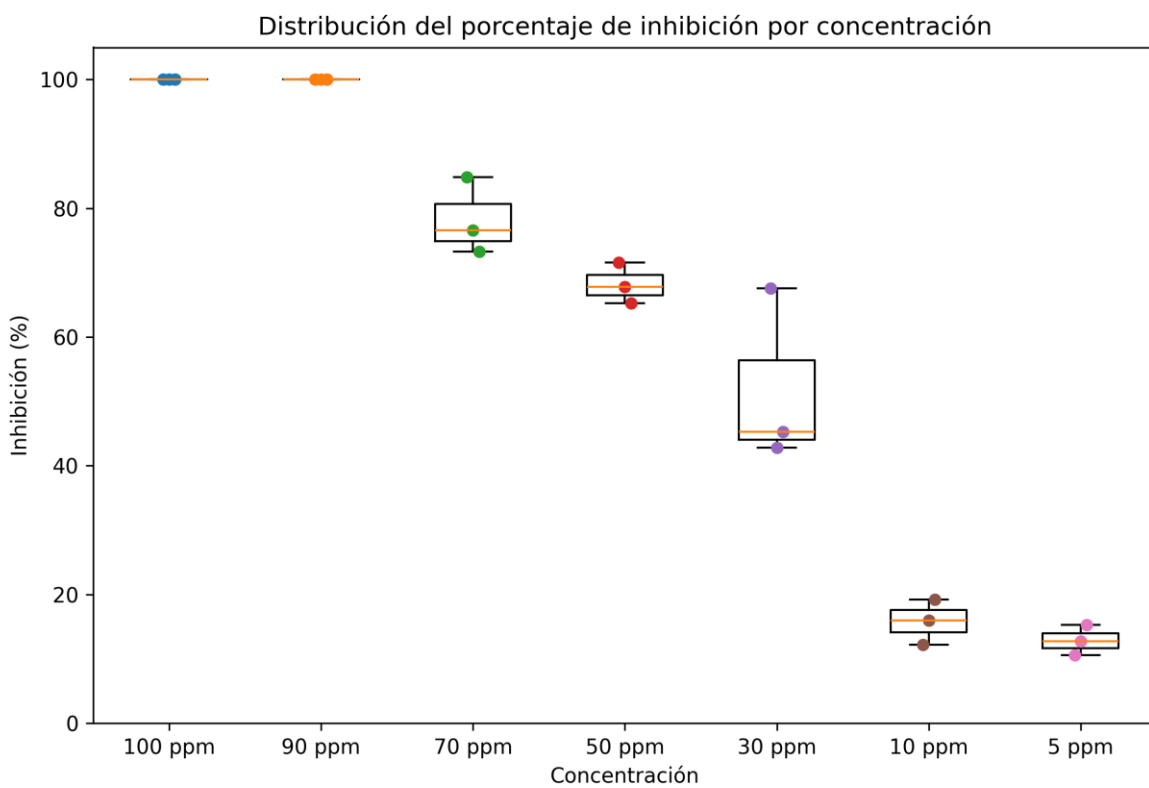


Figura 25. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración (Molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra *Fusarium spp.*).

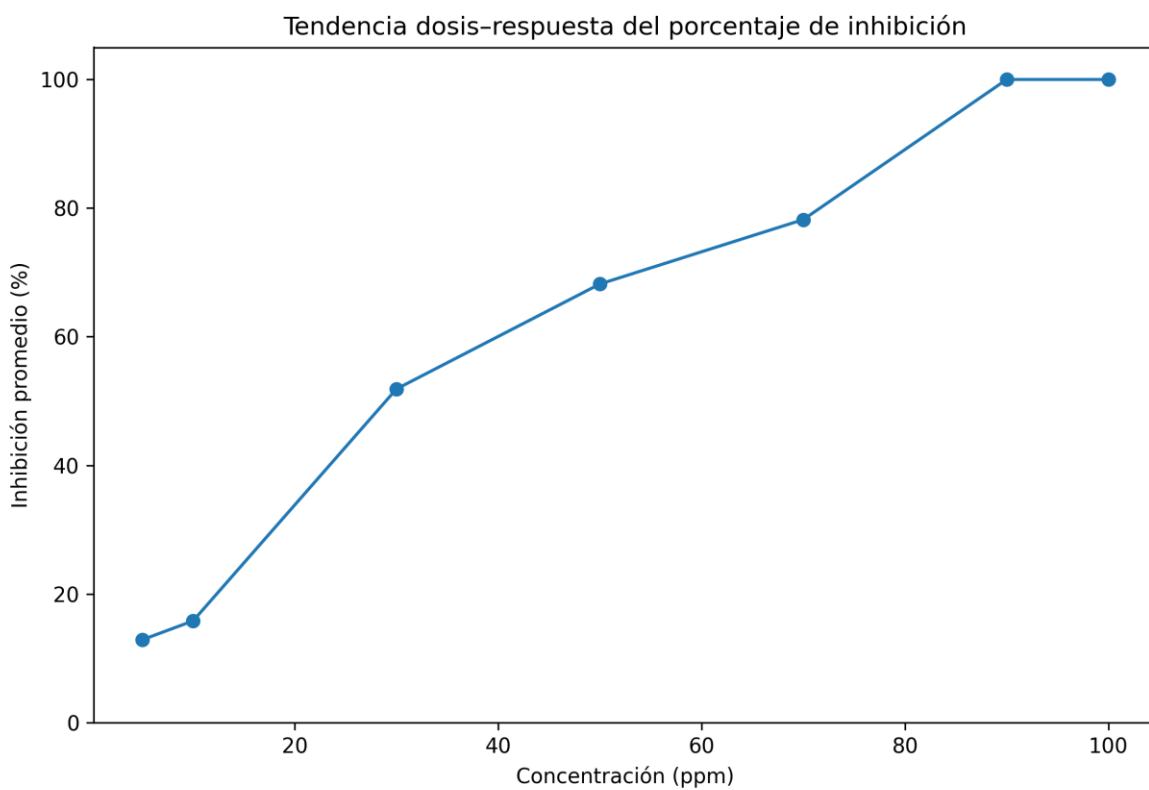


Figura 26. Tendencia dosis-respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración. (Molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra *Fusarium spp*)

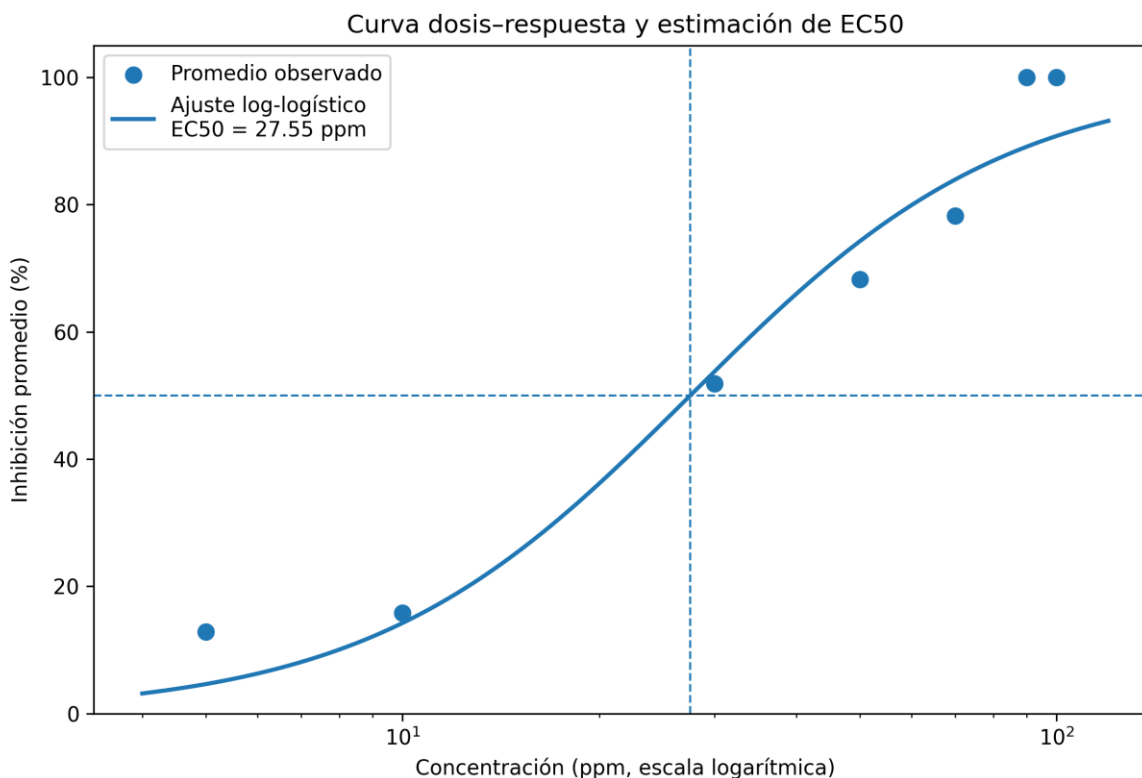


Figura 27. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica a partir de datos experimentales de inhibición micelial de *Fusarium spp* tratados con la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol y estimación de IC₅₀ (27.55 ppm)

La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas, $H(6) = 19.34$, $p = .004$. Además, la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia creciente significativa en el porcentaje de inhibición a medida que aumentó la concentración, $J = 181.50$, $p < .001$. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, la molécula sola mostró un efecto inhibitorio creciente sobre *Fusarium* conforme aumentó la concentración. El ajuste de la curva dosis–respuesta estimó un IC₅₀ de 27.55 ppm, lo que indica que dicha concentración produce aproximadamente 50% de inhibición del crecimiento. Desde una perspectiva biológica, los datos muestran un patrón dosis–dependiente claro: la inhibición fue baja a 5 y 10 ppm, aumentó notablemente a 30 y 50 ppm, y alcanzó inhibición completa a partir de 90 ppm.

5.4 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Tebuconazol contra *Fusarium spp*

La evaluación *In vitro* de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol sobre el crecimiento micelial de *Fusarium spp.* evidenció una alta efectividad en concentraciones elevadas, seguida de una disminución gradual conforme se redujo la dosis aplicada (Cuadro 16).

Se observó que las concentraciones de 100, 90 y 70 ppm inhibieron completamente el desarrollo del patógeno, alcanzando valores de 100% de inhibición en todas las repeticiones. A partir de 50 ppm, el efecto comenzó a disminuir, con valores de inhibición entre 70.32% y 76.41%.

En concentraciones intermedias, como 30 ppm, la inhibición se mantuvo en niveles moderados (alrededor de 60–65%). Posteriormente, a 10 ppm, el efecto antifúngico descendió a aproximadamente 50%, mientras que a 5 ppm se registraron valores cercanos al 40–46%. En la figura 24 se puede observar el efecto inhibitorio de molécula 3 tienil 5 azido pirazol en combinación con tebuconazol.

Cuadro 16: Concentraciones y porcentajes de inhibición de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol sola

Concentración	Porcentaje de inhibición	Porcentaje de inhibición	Porcentaje de inhibición
100 ppm	100	100	100
90 ppm	100	100	100
70 ppm	100	100	100
50 ppm	76.41	70.32	74.32
30 ppm	63.11	60.23	65.32
10 ppm	51.62	50.55	49.25
5 ppm	46.41	46.1	40.23

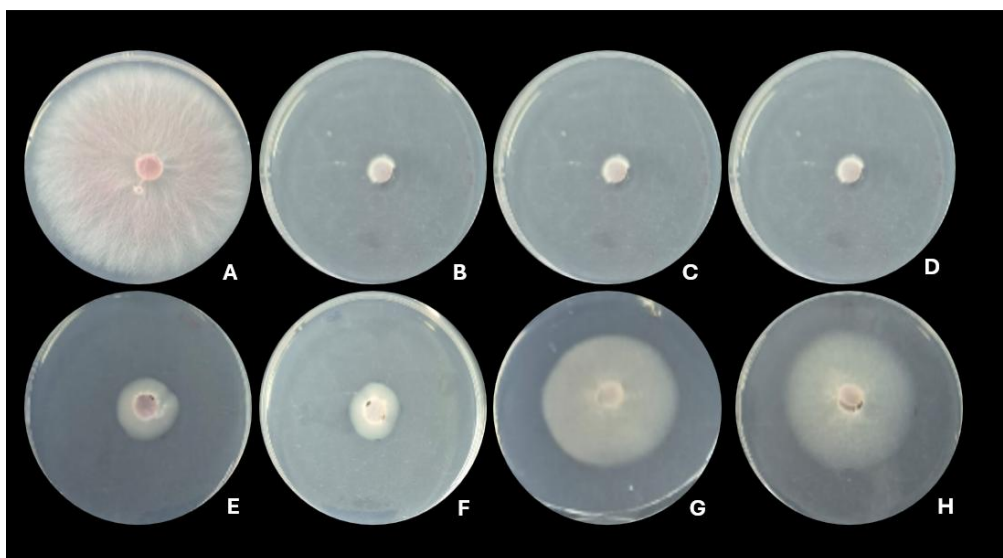


Figura 17: Crecimiento micelial de *Fusarium spp* en cajas Petri donde A=Testigo, B =9.9 mg ARP + 0.1 mg t, C= 8.91 mg ARP + 0.09 mg t, D 6.93 mg ARP + 0.07 mg t, E= 4.95 mg ARP+ 0.05 mg t F=2.97 mg ARP + 0.03 mg t G=0.99 mg AZP + 0.01 mg t H=0.48 donde ARP= 3 tienil 5 azido pirazol y t= tebuconazol.

Se aplicaron dos pruebas no paramétricas: Kruskal–Wallis para evaluar diferencias globales entre concentraciones y Jonckheere–Terpstra para evaluar una tendencia ordenada creciente.

Cuadro 18: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración

Prueba	n	Estadístico	gl	p	Conclusión
Kruskal–Wallis	21	H = 19.77	6	.003	Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas.
Jonckheere–Terpstra	21	J = 175.50	—	< .001	Se observó una tendencia creciente significativa del porcentaje de inhibición al aumentar la concentración.

Nota. Se analizaron siete concentraciones con tres réplicas por grupo (n total = 21). Para Jonckheere–Terpstra se asumió una alternativa creciente, coherente con la hipótesis de respuesta dosis–dependiente.

Se ajustó un modelo log-logístico de dos parámetros para estimar la concentración efectiva media (IC_{50}), entendida como la concentración necesaria para producir 50% de inhibición. El modelo estimó un IC_{50} de 8.70 ppm y una pendiente de 0.95. Este valor indica una actividad inhibitoria moderada a alta de la combinación molécula + tebuconazol contra *Fusarium*.

5.4.1 Gráficos representativos

A continuación, se incluyen los gráficos elaborados para mostrar la distribución de los datos, la tendencia dosis–respuesta y la curva ajustada empleada para la estimación del IC_{50} .

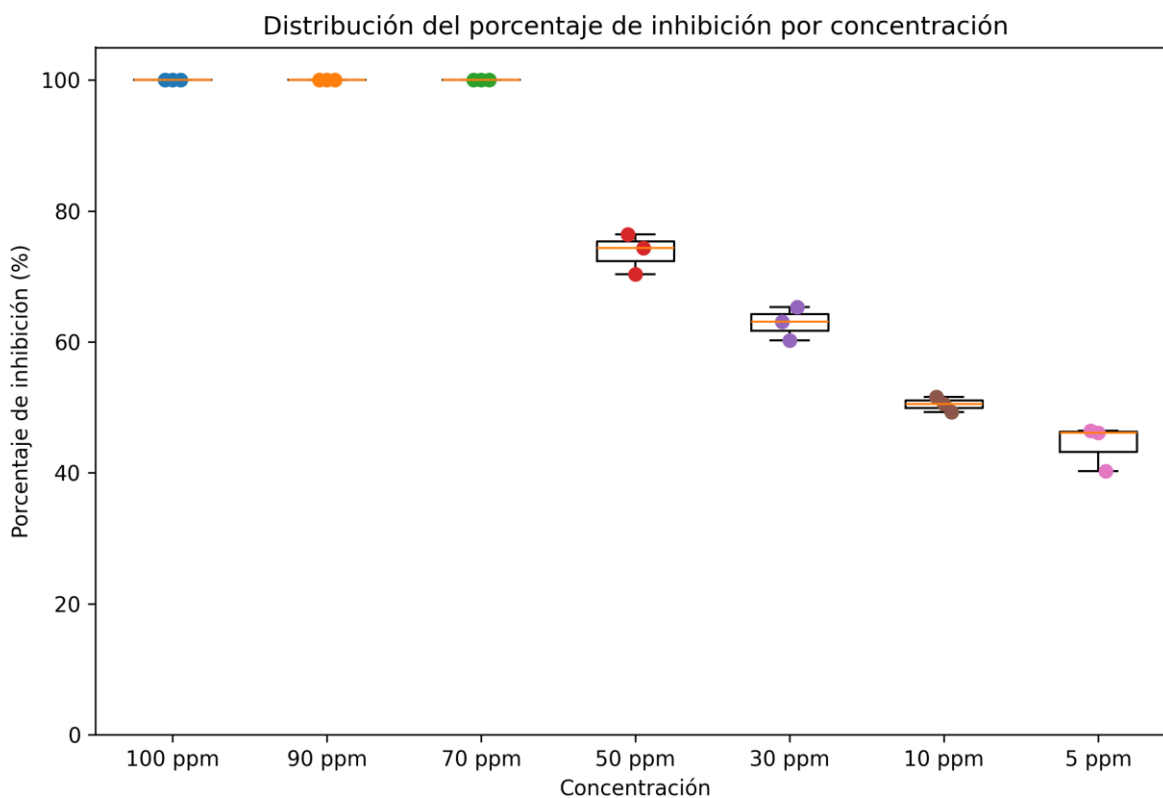


Figura 28. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración (*Fusarium spp* contra molécula 3 tienil 5 azido pirazol junto con tebuconazol)

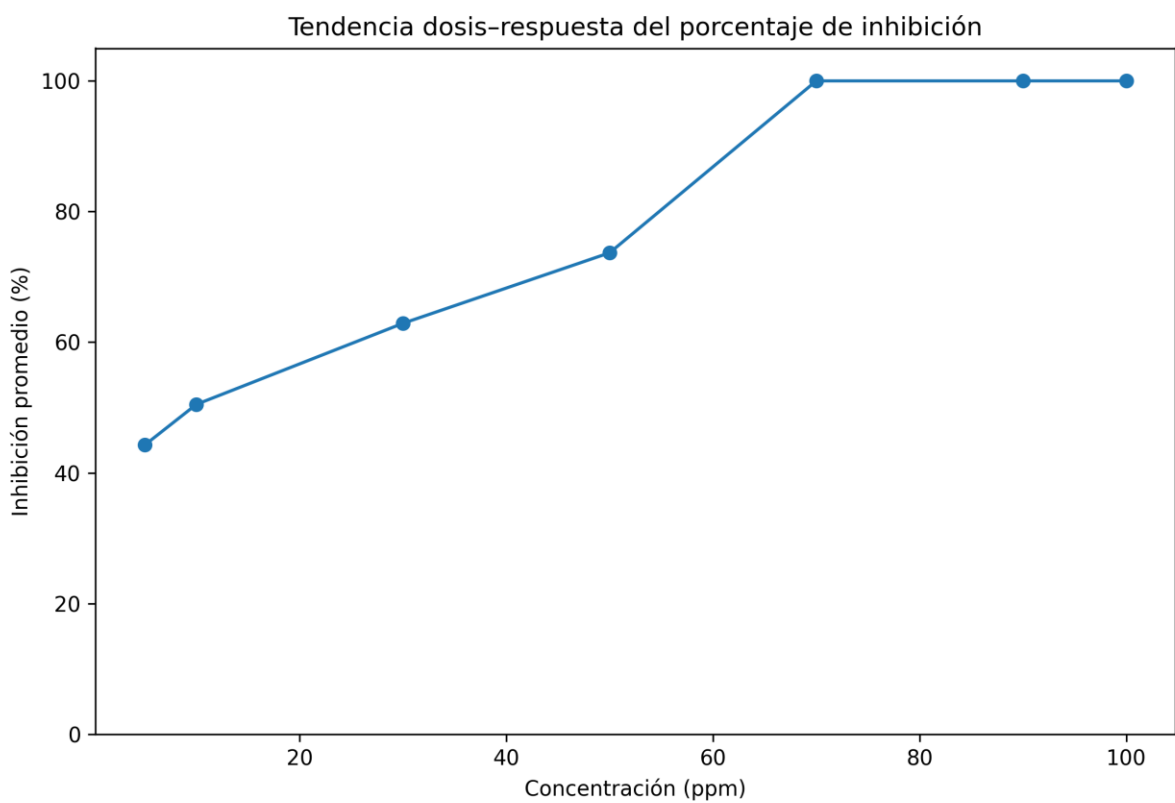


Figura 29. Tendencia dosis-respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración. (*Fusarium spp* contra molécula 3 tienil 5 azido pirazol junto con tebuconazol),

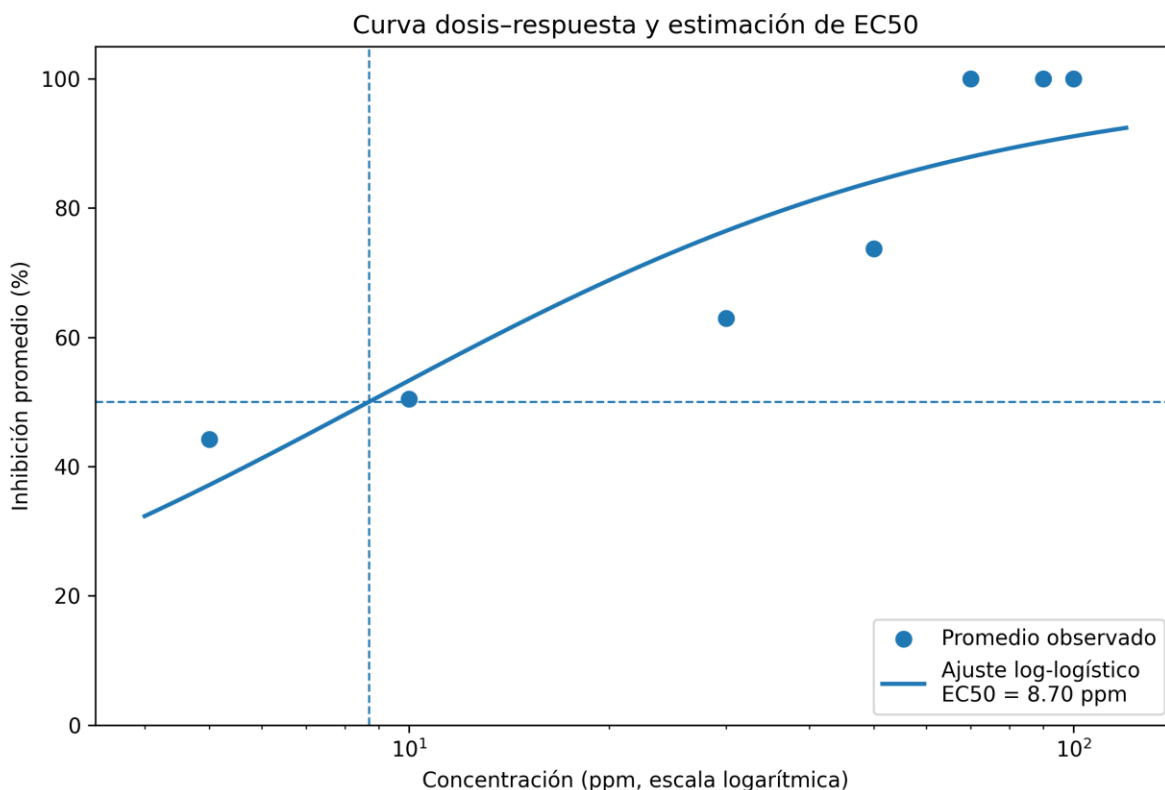


Figura 30. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica a partir de datos experimentales de inhibición micelial de *Fusarium spp* tratados con la molécula 3 tienil 5 azido pirazol más tebuconazol con una estimación de IC₅₀ 8.70 ppm

La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas, $H(6) = 19.77$, $p = .003$. Además, la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia creciente significativa en el porcentaje de inhibición a medida que aumentó la concentración, $J = 175.50$, $p < .001$. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, la combinación de 3-tienil-5-azido pirazol con tebuconazol mostró un efecto inhibitorio creciente y marcado sobre *Fusarium* conforme aumentó la concentración. El ajuste de la curva dosis–respuesta estimó un IC₅₀ de 8.70 ppm, lo que indica que dicha concentración produce aproximadamente 50% de inhibición del crecimiento. Desde una perspectiva biológica, los datos muestran un patrón consistente de respuesta dosis–dependiente: la inhibición aumenta de 5 a 50 ppm y luego se estabiliza en 100% a partir de 70 ppm. Este

comportamiento refuerza la interpretación de un efecto fuerte y sostenido de la combinación sobre el crecimiento del hongo.

5.5 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Nanopartículas de plata contra *Fusarium spp*

La combinación de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol con nanopartículas de plata mostró una respuesta antifúngica limitada frente a *Fusarium spp.* bajo condiciones *In vitro*, con una clara disminución de la eficacia a medida que se redujo la concentración (Cuadro 19).

En la concentración más alta evaluada (50 ppm), se obtuvo una inhibición promedio de 70.46%, lo que indica un efecto moderado sobre el crecimiento micelial. Sin embargo, al disminuir la dosis a 10 ppm, la inhibición se redujo considerablemente, alcanzando valores cercanos al 44% en las repeticiones.

A 5 ppm, el efecto antifúngico fue aún menor, con valores aproximados de 22–23%, evidenciando una baja capacidad inhibitoria. En contraste, en las concentraciones de 2.5 y 1 ppm, no se registró inhibición del patógeno, observándose un crecimiento micelial completo, en la figura 23 se puede observar el efecto sinérgico de la combinación de la molécula con nanopartículas de plata.

Cuadro 19: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium spp.* por efecto de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol en combinación con nanopartículas de plata bajo condiciones *In vitro*..

Concentración	Porcentaje de inhibición	Porcentaje de inhibición	Porcentaje de inhibición	Promedio
50 ppm	71.67	69.25	68.5	70.46
10 ppm	46.3	43.15	44.3	29.8166667
5 ppm	22.66	23.25	22.1	15.3033333
2.5 ppm	0	0	0	0
1 ppm	0	0	0	0

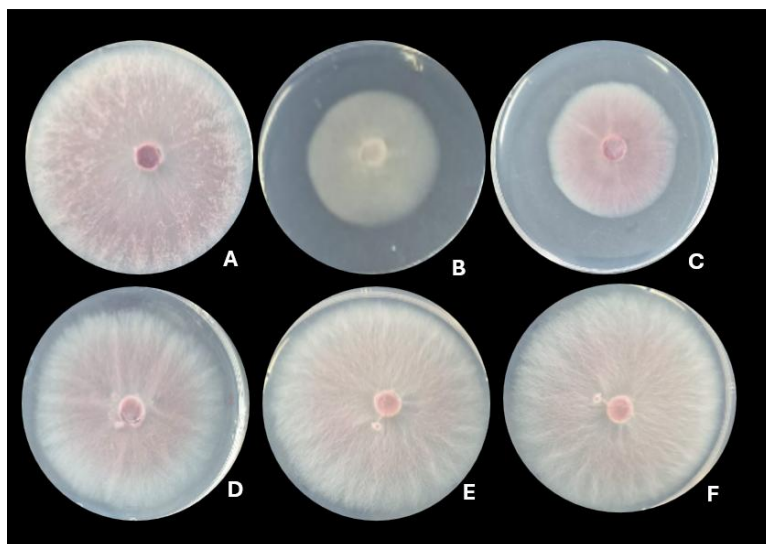


Figura 23: Crecimiento micelial de *Fusarium spp* en cajas Petri donde A=Testigo, B=6.93 mg ARP + 2.5 ml Ag C=0.99 mg ARP + 0.5 ml Ag, D=0.48 mg ARP + 0.25 ml Ag, E=0.24 mg ARP + 0.175 ml Ag, G=0.09 mg ARP + 0.05 ml Ag, donde ARP= 3 tienil 5 azido pirazol y Ag= Nanopartículas de plata.

Debido a la falta de normalidad en los residuales y al patrón de respuesta con valores nulos en dosis bajas, se aplicaron dos pruebas no paramétricas: Kruskal–Wallis para evaluar diferencias globales entre concentraciones y Jonckheere–Terpstra para evaluar una tendencia ordenada creciente.

Cuadro 20: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración

Prueba	n	Estadístico	gl	p	Conclusión
Kruskal–Wallis	15	H = 13.68	4	.008	Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas.
Jonckheere–Terpstra	15	J = 85.50	—	< .001	Se observó una tendencia creciente significativa del

porcentaje de
inhibición al aumentar
la concentración.

Nota. Se analizaron cinco concentraciones con tres réplicas por grupo (n total = 15). Para Jonckheere–Terpstra se asumió una alternativa creciente, coherente con la hipótesis de respuesta dosis–dependiente.

Se ajustó un modelo log-logístico de dos parámetros para estimar la concentración efectiva media (IC_{50}), entendida como la concentración necesaria para producir 50% de inhibición. El modelo estimó un IC_{50} de 17.37 ppm y una pendiente de 1.07. Este valor indica que la concentración requerida para alcanzar 50% de inhibición se ubica entre 10 y 50 ppm.

5.5.1 Gráficos representativos

A continuación, se incluyen los gráficos elaborados para mostrar la distribución de los datos, la tendencia dosis–respuesta y la curva ajustada empleada para la estimación del IC_{50} .

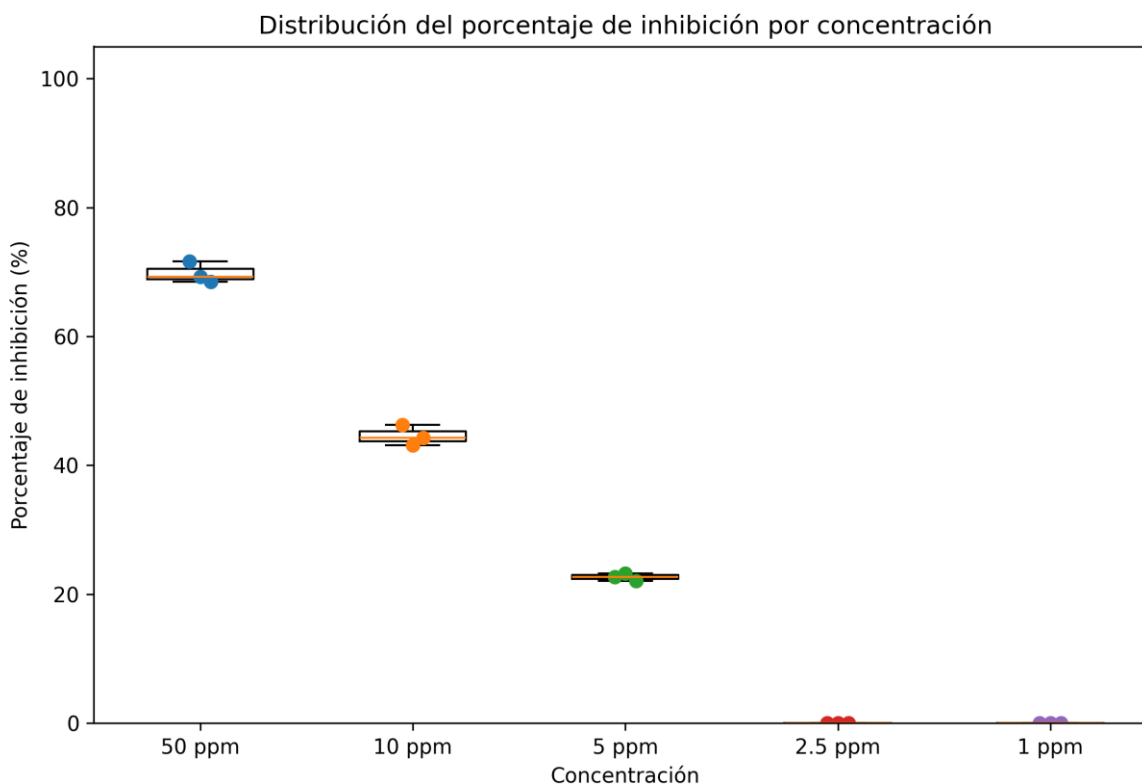


Figura 31. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración (*Fusarium spp* contra molécula 3 tienil 5 azido pirazol junto con nanopartículas de plata)

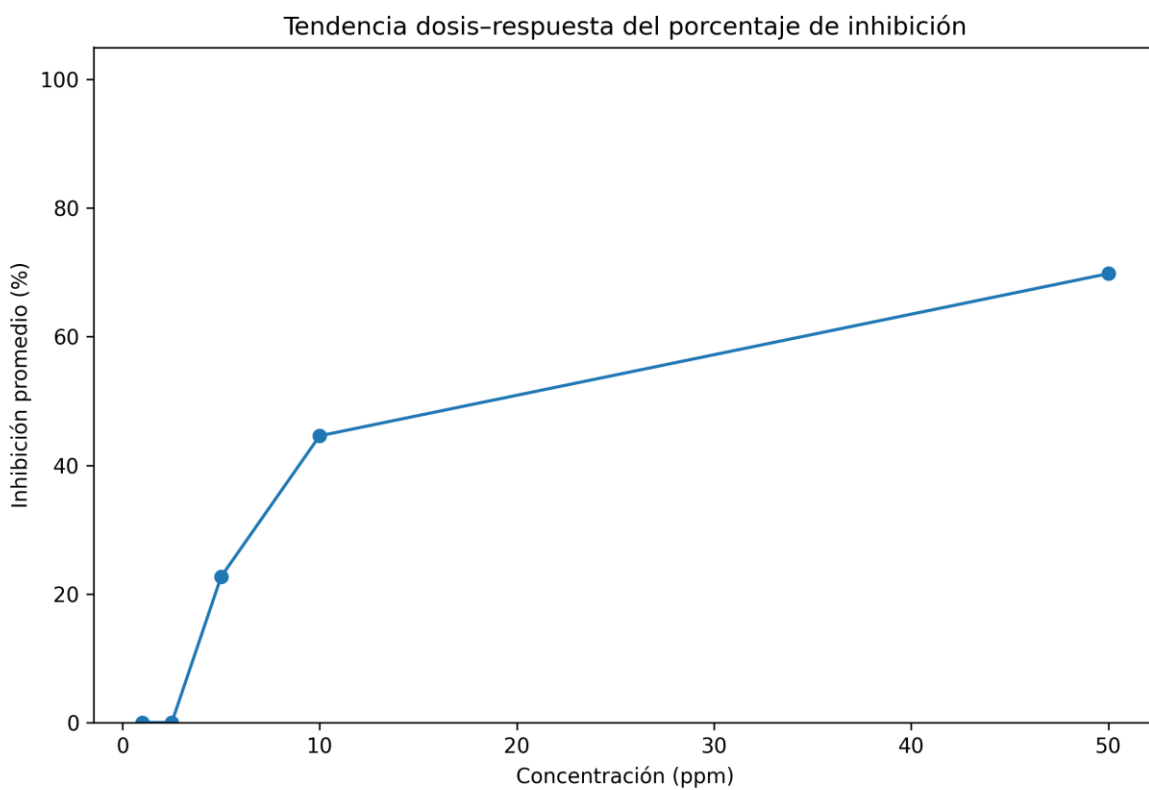


Figura 32. Tendencia dosis-respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración. (*Fusarium spp*, contra molécula 3 tienil 5 azido pirazol junto con nanopartículas de plata)

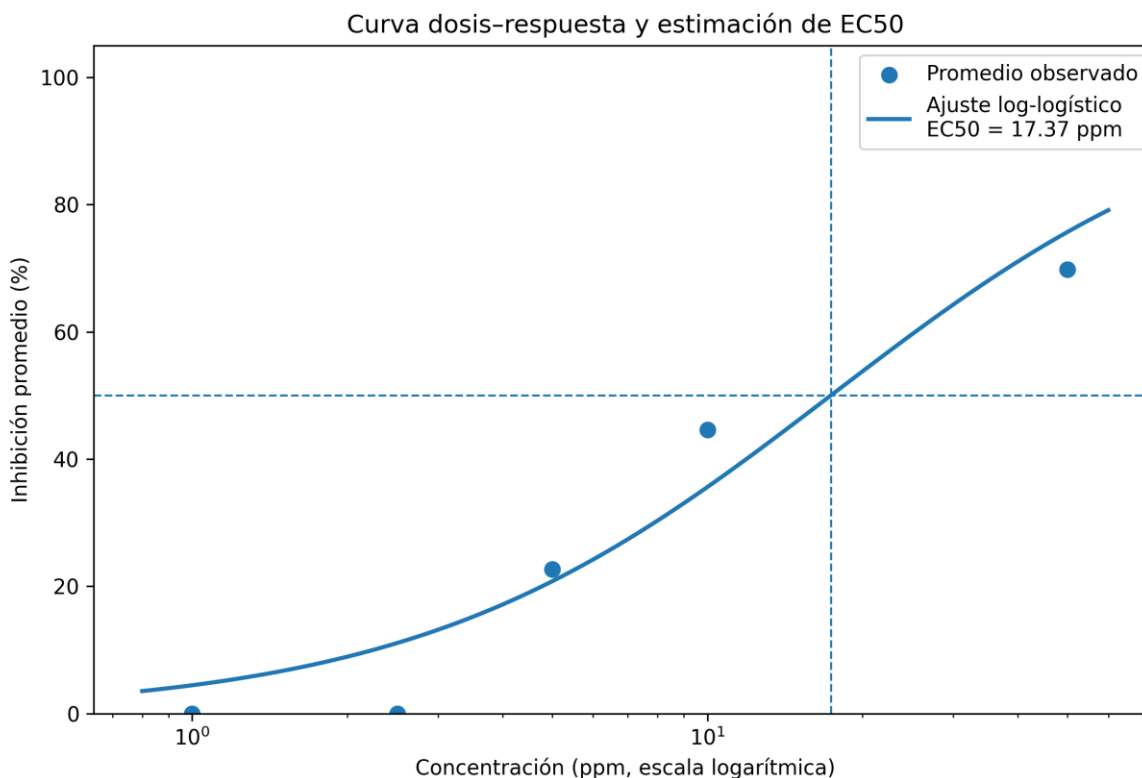


Figura 33. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica a partir de datos experimentales de inhibición micelial de *Fusarium spp* tratados con la molécula 3 tienil 5 azido pirazol más nanopartículas de plata con una estimación de IC₅₀ 17.37 ppm.

La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas, $H(4) = 13.68$, $p = .008$. Además, la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia creciente significativa en el porcentaje de inhibición a medida que aumentó la concentración, $J = 85.50$, $p < .001$. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, la molécula con nanopartículas mostró un efecto inhibitorio creciente sobre *Fusarium* conforme aumentó la concentración. El ajuste de la curva dosis–respuesta estimó un IC₅₀ de 17.37 ppm, lo que indica que dicha concentración produce aproximadamente 50% de inhibición del crecimiento. Desde una perspectiva biológica, los datos muestran un patrón consistente de respuesta dosis–dependiente: la inhibición fue nula en 1 y 2.5 ppm, aumentó a 22.67% en 5 ppm, alcanzó 44.58% en 10 ppm y llegó a 69.81% en 50 ppm.

5.6 Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo evidencian que la molécula 3-tienil-5-azido pirazol presenta actividad antifúngica contra *Fusarium spp.*, mostrando un comportamiento dependiente de la concentración, consistente con lo observado en los capítulos anteriores. No obstante, con el fin de evitar redundancias, los mecanismos de acción asociados al núcleo pirazol, así como el efecto de las combinaciones con tebuconazol y nanopartículas de plata, ya fueron abordados previamente, por lo que en esta sección se enfatiza la respuesta particular del patógeno evaluado.

La respuesta de *Fusarium spp.* muestra diferencias relevantes en términos de sensibilidad al tratamiento. Esto puede explicarse por su naturaleza como patógeno del suelo, su alta variabilidad genética y su capacidad de formar estructuras de resistencia las cuales pueden sobrevivir en condiciones completamente adversas por muchos años. (Summerell et al, 2006). Estas características pueden influir en la menor o más gradual inhibición observada a concentraciones bajas del tratamiento.

La tendencia dosis–respuesta observada confirma que la molécula mantiene actividad biológica frente a este patógeno; sin embargo, la eficacia depende directamente de la concentración aplicada, lo cual es particularmente relevante en *Fusarium spp.*, ya que este género presenta una elevada capacidad de adaptación a una gran variedad de hábitats y, aunque muestran afinidad por climas templados, son capaces de contaminar cultivos en todo el mundo (Ekwomadu, et al 2019). La aplicación de fungicidas es la práctica más utilizada para el control de *Fusarium*. Sin embargo, debido a la rápida aparición de cepas resistentes, la eficacia de estos agentes de protección vegetal solo puede mantenerse si se desarrollan constantemente nuevos compuestos efectivos. Otra estrategia para controlar la actividad de *Fusarium* es el uso de mezclas de fungicidas con múltiples ingredientes activos (Buchneva et al 2019).

En cuanto a las combinaciones evaluadas, el efecto con tebuconazol sugiere nuevamente una mejora en la eficacia antifúngica, lo que refuerza la importancia de estrategias combinadas para el control de patógenos con alta capacidad de resistencia. Por otro lado, la combinación con nanopartículas de plata mostró una respuesta

dependiente de la concentración, con una disminución en la inhibición a dosis bajas, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de *Fusarium spp.* para tolerar estrés oxidativo y mantener su viabilidad en condiciones adversas.

Desde el punto de vista estadístico, las diferencias significativas entre concentraciones y la tendencia creciente en la inhibición confirman que el efecto observado no es aleatorio, sino resultado directo de la acción del tratamiento, lo que respalda la hipótesis planteada en el estudio.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que, aunque la molécula 3-tienil-5-azido pirazol presenta actividad antifúngica contra *Fusarium spp.*, su eficacia está influenciada por las características biológicas del patógeno, lo que resalta la necesidad de considerar este tipo de variables en el desarrollo de nuevas estrategias de control.

5.7 Conclusión

La molécula 3-tienil-5-azido pirazol demostró actividad antifúngica contra *Fusarium spp.* en condiciones *In vitro*. Su efecto resultó dependiente de la concentración, alcanzando inhibiciones cercanas al 100% en concentraciones elevadas (70–100 ppm). En concentraciones intermedias (50 ppm), el nivel de inhibición se ubicó entre el 70 y el 76%, mientras que en concentraciones bajas (5–10 ppm), la inhibición disminuyó considerablemente, registrándose valores entre el 40 y el 51%. Al combinarse con tebuconazol, la eficacia del tratamiento aumentó significativamente, lo que sugiere un efecto complementario entre ambos compuestos. Las concentraciones de 100, 90 y 70 ppm presentaron una inhibición del 100 % del crecimiento micelial de *Fusarium spp.*. A 50 ppm se registraron valores de inhibición de 74.32 %, mientras que a 30 ppm los porcentajes fueron de 63.11 %. En concentraciones menores, como 10 ppm, la inhibición osciló entre 49.25 % y 51.62 %, y a 5 ppm entre 40.23 % y 46.41 %. Por otro lado, la combinación con nanopartículas de plata mostró una actividad antifúngica dependiente de la concentración, alcanzando 69.81 % de inhibición a 50 ppm, 44.58 % a 10 ppm y 22.67 % a 5 ppm, mientras que las concentraciones de 1 y 2.5 ppm no presentaron inhibición del crecimiento micelial.

Los análisis estadísticos realizados confirmaron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas ($p < 0.05$), observándose una tendencia creciente en el porcentaje de inhibición conforme aumentó la concentración de los tratamientos. La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas entre tratamientos ($H = 19.77$; $p = .003$), mientras que la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia dosis–respuesta significativa. Además, el modelo log-logístico estimó un EC_{50} de 17.49 ppm para la molécula sola, 8.70 ppm para la combinación con tebuconazol y 17.37 ppm para la combinación con nanopartículas de plata, evidenciando una mayor eficacia del tratamiento combinado con tebuconazol. Estos resultados permitieron rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa, confirmando la actividad antifúngica de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol contra *Fusarium spp*. En conjunto, se concluye que la molécula 3-tienil-5-azido pirazol presenta potencial como agente antifúngico frente a *Fusarium spp.*, especialmente a concentraciones altas y en combinación con tebuconazol. Esto la posiciona como una alternativa viable dentro de estrategias de manejo integrado de enfermedades.

Literatura citada

- Abdel-Azeem, A.M.; Abdel-Azeem, M.A.; Darwish, A.G.; Nafady, N.A.; Ibrahim, N.A. *Fusarium: Biodiversity, ecological significances, and industrial applications*. In *Recent Advancement in White Biotechnology through Fungi*; Springer: Cham, Switzerland, 2019; pp. 201–261.
- Aoki, T.; O'Donnell, K.; Geiser, D.M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges. *J. Gen. Plant Pathol.* 2014, 80, 189–201.
- Bakker, M.G.; Brown, D.W.; Kelly, A.C.; Kim, H.S.; Kurtzman, C.P.; McCormick, S.P.; Ward, T.J. *Fusarium* mycotoxins: A trans-disciplinary overview. *Can. J. Plant Pathol.* 2018, 40, 161–171.

- Buchneva, G.N.; Gusev, I.V.; Korabelskaya, O.I.; Dubrovskaya, N.N.; Chekmarev, V.V. Varietal composition and frequency of fusarium presence on winter wheat varieties in the Tambov region. *Holoprystan Reg. Employ. Cent.* 2019, 2, 4–76. (In Russian)
- Cobo-Díaz, J.F.; Baroncelli, R.; Floch, G.L.; Picot, A. A novel metabarcoding approach to investigate *Fusarium* species composition in soil and plant samples. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2019, 95, 7.
- Dean, R.; van Kan, J.A.L.; Pretorius, Z.A.; Hammond-Kosack, K.E.; Di Pietro, A.; Spanu, P.D.; Rudd, J.J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant. Pathol.* 2012, 13, 414–430.
- Duan, C.; Qin, Z.; Yang, Z.; Li, W.; Sun, S.; Zhu, Z.; Wang, X. Identification of Pathogenic *Fusarium* spp. Causing Maize Ear Rot and Potential Mycotoxin Production in China. *Toxins* 2016, 8, 186.
- Ekwomadu, T.I. Occurrence and Variation of *Fusarium* Free and Masked Mycotoxins in Maize from Agriculture Regions of South Africa. Doctoral Dissertation, North-West University, Potchefstroom, South Africa, 2019.
- Ekwomadu, T.I. Occurrence and Variation of *Fusarium* Free and Masked Mycotoxins in Maize from Agriculture Regions of South Africa. Doctoral Dissertation, North-West University, Potchefstroom, South Africa, 2019.
- Kuhnem, P.; Ward, T.; Silva, C.; Spolti, P.; Ciliato, M.; Tessmann, D.; Del Ponte, E. Composition and toxigenic potential of the *Fusarium graminearum* species complex from maize ears, stalks and stubble in Brazil. *Plant Pathol.* 2016, 65, 1185–1191.
- Ma, L.-J.; Geiser, D.M.; Proctor, R.H.; Rooney, A.P.; O'Donnell, K.; Trail, F.; Gardiner, D.M.; Manners, J.M.; Kazan, K. *Fusarium* Pathogenomics. *Annu. Rev. Microbiol.* 2013, 67, 399–416.
- Munkvold, G.P. *Fusarium* Species and Their Associated Mycotoxins. In *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*; Moretti, A., Susca, A., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2017; pp. 51–106.

- Nganje, W.E.; Bangsund, D.A.; Leistritz, F.L.; Wilson, W.W.; Tiapo, N.M. Regional Economic Impacts of Fusarium Head Blight in Wheat and Barley. *Appl. Econ. Perspect. Policy* 2004, 26, 332–347.
- Rampersad, S.N. Pathogenomics and Management of Fusarium Diseases in Plants. *Pathogens* 2020, 9, 340.
- Rampersad, S.N. Pathogenomics and management of Fusarium diseases in plants. *Pathogens* 2020, 9, 340.
- Summerell, B.A. Resolving Fusarium: Current status of the genus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2019, 57, 323–339
- SUMMERELL, BRETT A., Baharuddin, Salleh And Leslie, John F. 2003. A Utilitarian Approach to Fusarium Identification. The American Phytopathological Society. Publication no. D-2002-1206-01F. *Plant Disease*, Vol. 87 No. 2
- Tapia, Cecilia, & Amaro, José. (2014). Género Fusarium. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 85-86. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000100012>
- Timmusk, S.; Nevo, E.; Ayele, F.; Noe, S.; Niinemets, Ü. Fighting Fusarium pathogens in the era of climate change: A conceptual approach. *Pathogens* 2020, 9, 419.
- Waller, J.M.; Brayford, D. Fusarium diseases in the tropics. *Trop. Pest Manag.* 1990, 36, 181–194.
- Zakaria, L. Fusarium Species Associated with Diseases of Major Tropical Fruit Crops. *Horticulturae* 2023, 9, 322.

CAPITULO 6 ESTUDIOS *IN VITRO* DE 3 TIENIL 5 AZIDO PIRAZOL SOLA Y EN COMBINACIÓN CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y TEBUCONAZOL CONTRA *Neopestalotiopsis spp*

Resumen

Se evaluó la actividad antifúngica de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol contra *Neopestalotiopsis spp.*, un patógeno emergente de importancia en cultivos como fresa, bajo condiciones *In vitro*.

Los resultados mostraron un efecto dependiente de la concentración, con inhibiciones cercanas al 100% en concentraciones altas, valores intermedios entre 70 y 85% y una disminución considerable a concentraciones bajas. La combinación con tebuconazol presentó una mayor eficacia antifúngica, registrando inhibiciones del 100 % en 100, 90, 70 y 50 ppm. A 30 ppm se obtuvo una inhibición promedio de 81.17 %, mientras que a 10 y 5 ppm los valores fueron de 60.80 % y 19.12 %, respectivamente. El EC_{50} estimado para la combinación con tebuconazol fue de 9.06 ppm. Por otro lado, la combinación con nanopartículas de plata presentó inhibiciones de 84.83 % a 50 ppm, 41.70 % a 10 ppm y 19.51 % a 5 ppm, mientras que las concentraciones de 1 y 2.5 ppm no mostraron inhibición del crecimiento micelial. El IC_{50} estimado para esta combinación fue de 13.77 ppm.

6.1 Introducción

Neopestalotiopsis spp. es un patógeno crítico que causa graves pérdidas económicas al reducir tanto la población por hectárea como el rendimiento total de las plantas corredoras. Los informes de infección *por Neopestalotiopsis spp.* en arándanos y fresas han sido consistentes en todo el mundo (Jevremović et al, 2022, Rodríguez et al, 2020, Espinoza, et al, 2008, Chandana, et al 2024). México, Estados Unidos y China están entre los países productores de fresas más afectados.

La infección de los cultivos de fresa por especies *de Neopestalotiopsis spp.*, depende de varios factores, incluyendo la susceptibilidad de los cultivares, el uso de plantas libres de

enfermedades procedentes de viveros y prácticas efectivas de gestión en el campo por parte de los agricultores.

Neopestalotiopsis spp. pueden sobrevivir en suelo y residuos vegetales incluso en parterres cubiertos con mantillo negro y tierra labrada tras varias temporadas de cosecha de fresas. (Zuniga et al, 2024), informaron que *Neopestalotiopsis spp.* puede tolerar altas temperaturas (≤ 40 °C).

La agresividad y persistencia del patógeno en restos vegetales, suelo y otros reservorios de inóculo aseguran la supervivencia estación tras temporada y la rápida reaparición en condiciones favorables, haciendo que la gestión sea especialmente complicada (Baggio et al., 2021; Zuniga et al., 2024). Hasta la fecha, las estrategias de manejo de enfermedades se han basado principalmente en un enfoque integrado que combina métodos culturales y químicos. Estos incluyen la plantación de plantas libres de patógenos, si está disponible, prácticas de saneamiento en campo, rotación de cultivos para reducir la acumulación de inóculos, eliminación de plantas infectadas, aplicación de agentes de biocontrol y tratamientos fungicidas (Amrutha y Vijayaraghavan, 2018; Baggio et al., 2019, 2023; Goura et al., 2025; Zuniga et al., 2024). Sin embargo, el uso de fungicidas está limitado por la limitada eficacia de los productos registrados frente a este complejo patógeno, las limitaciones regulatorias sobre la frecuencia de aplicación, las preocupaciones de sostenibilidad ambiental y la aparición de resistencia a los hongos en poblaciones de patógenos.

Dada la creciente prevalencia de *Neopestalotiopsis*, su importante impacto económico y la eficacia limitada de las medidas de control disponibles, existe una necesidad crítica de esfuerzos de investigación integrales y multidisciplinarios. Estos esfuerzos deben combinar biología de patógenos, diagnóstico, epidemiología y estrategias de manejo integradas, incluidos los avances en la mejora, para abordar estos problemas.

6.2 Materiales y métodos

Los ensayos realizados en *Neopestalotiopsis spp.* se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones experimentales descritas para *Sclerotium cepivorum* (Capítulo 2). Las únicas variaciones correspondieron a las condiciones específicas de crecimiento de cada patógeno, particularmente en el tiempo de incubación y desarrollo micelial.

6.3 Resultados

6.3.1 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol contra *Neopestalotiopsis spp*

La actividad antifúngica de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol frente a *Neopestalotiopsis spp.* mostró una respuesta dependiente de la concentración bajo condiciones *In vitro* (Cuadro 21).

En las concentraciones más altas (100 y 90 ppm), se observó una inhibición total del crecimiento micelial (100%), lo que evidencia una alta eficacia del compuesto en estas dosis. Sin embargo, al reducir la concentración a 70 ppm, la inhibición disminuyó a un promedio de 78.06%, indicando una pérdida parcial de la actividad antifúngica.

Esta tendencia continuó de manera progresiva en las concentraciones subsecuentes: a 50 ppm se registró una inhibición promedio de 68.71%, mientras que a 30 ppm el efecto se redujo a 61.27%. En concentraciones más bajas, como 10 ppm, la inhibición descendió notablemente hasta 38.17%, y finalmente a 5 ppm se obtuvo únicamente 18.55%, reflejando una actividad antifúngica limitada. En la figura 34 se puede observar el efecto inhibitorio de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol sola.

Cuadro 21: Concentraciones en ppm de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con tres repeticiones

Concentración	Porcentaje de inhibición	Porcentaje de inhibición	Porcentaje de inhibición	Promedio
100 ppm	100	100	100	100
90 ppm	100	100	100	100
70 ppm	75.67	78.25	80.25	78.05
50 ppm	69.12	66.77	70.25	68.71
30 ppm	55.27	63.3	65.25	61.27
10 ppm	31.08	43.21	40.23	38.17
5 ppm	14.61	21.78	19.25	18.54

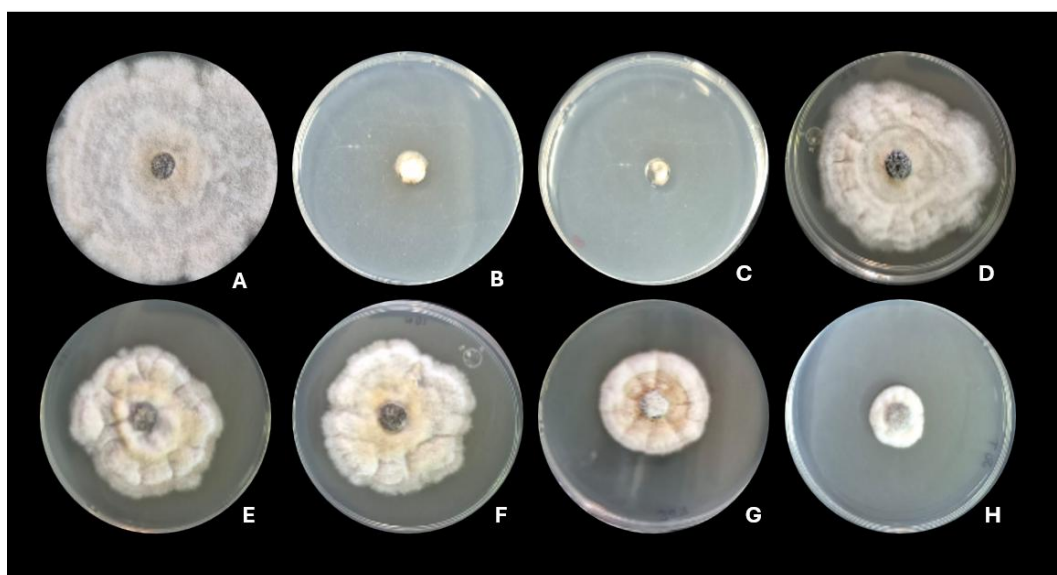


Figura 34: Crecimiento micelial de *Fusarium* spp en cajas Petri bajo diferentes concentraciones del tratamiento de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol, donde A:Testigo, B:100 ppm, C:90 ppm, D: 70 ppm, E:50 ppm, F: 30 ppm, G: 10 ppm y H:10 ppm

Se aplicaron dos pruebas no paramétricas: Kruskal–Wallis para evaluar diferencias globales entre concentraciones y Jonckheere–Terpstra para evaluar una tendencia ordenada creciente del porcentaje de inhibición conforme aumenta la concentración.

Cuadro 22: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración

Prueba	n	Estadístico	gl	p	Conclusión
Kruskal–Wallis	21	H = 19.73	6	.003	Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas.
Jonckheere–Terpstra	21	J = 184.50	—	< .001	Se observó una tendencia creciente significativa del porcentaje de inhibición al

aumentar la
concentración.

Nota. Se analizaron siete concentraciones con tres réplicas por grupo (n total = 21). Para Jonckheere–Terpstra se asumió una alternativa creciente, coherente con la hipótesis de respuesta dosis–dependiente.

Se ajustó un modelo log-logístico de dos parámetros para estimar la concentración efectiva media (IC_{50}), entendida como la concentración necesaria para producir 50% de inhibición. El modelo estimó un IC_{50} de 17.49 ppm y una pendiente de 1.21. Este valor indica que, bajo las condiciones evaluadas, aproximadamente 17.49 ppm serían necesarios para alcanzar el 50% de inhibición del crecimiento de *Neopestalotiopsis*.

6.3.2 Gráficos representativos

A continuación, se incluyen los gráficos elaborados para mostrar la distribución de los datos, la tendencia dosis–respuesta y la curva ajustada empleada para la estimación del IC_{50} .

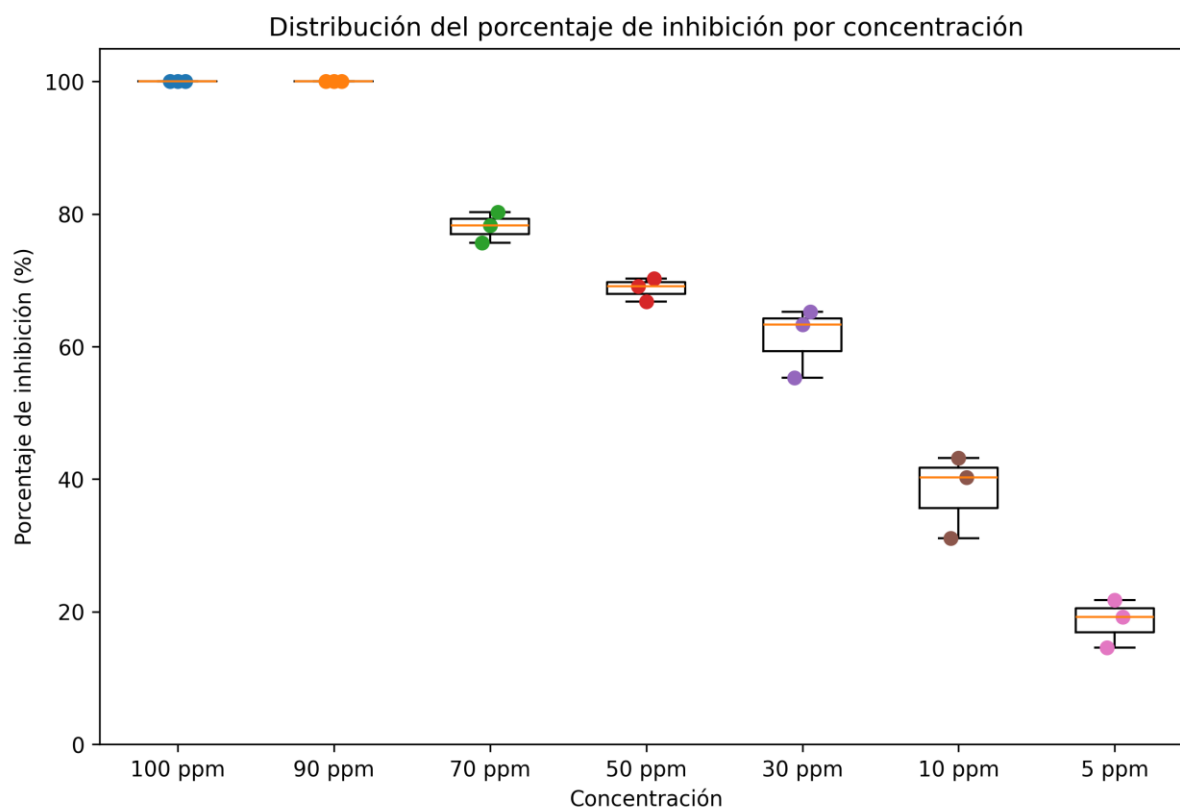


Figura 35. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración de la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol contra *Neopestalotiopsis spp*

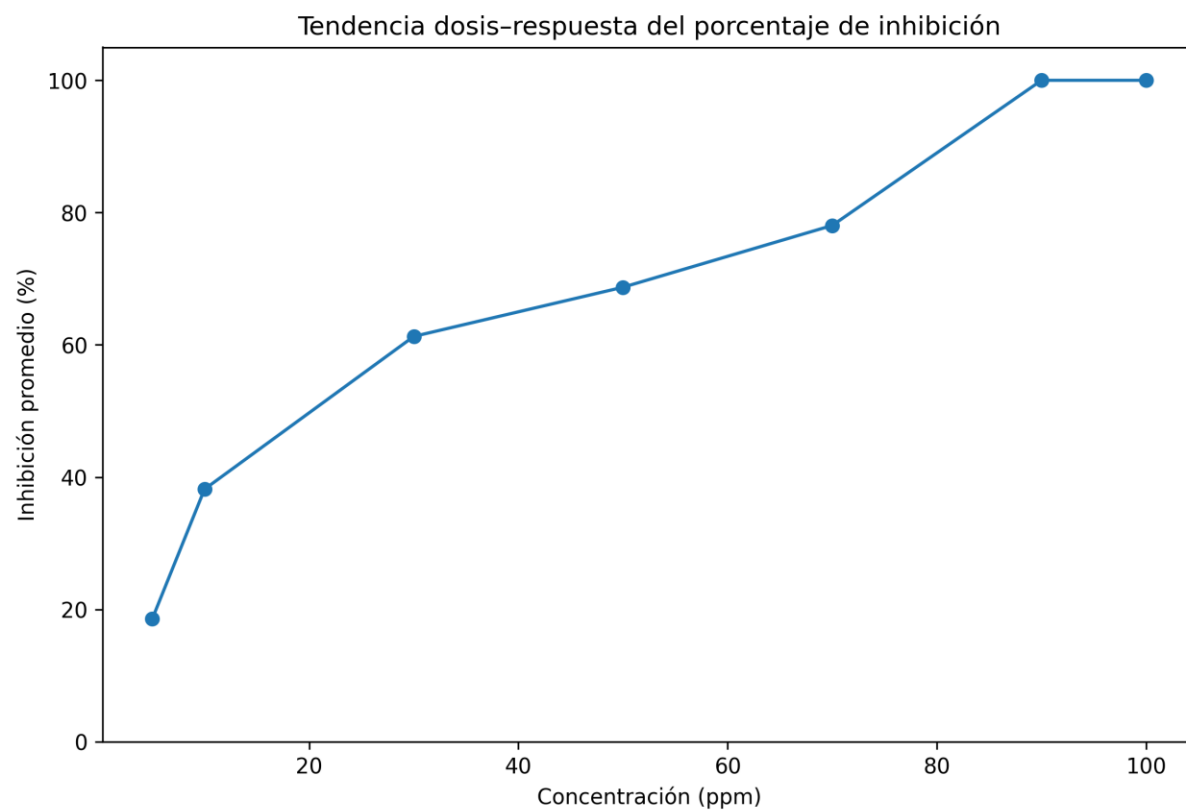


Figura 36. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración de la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol contra *Neopestalotiopsis spp.*

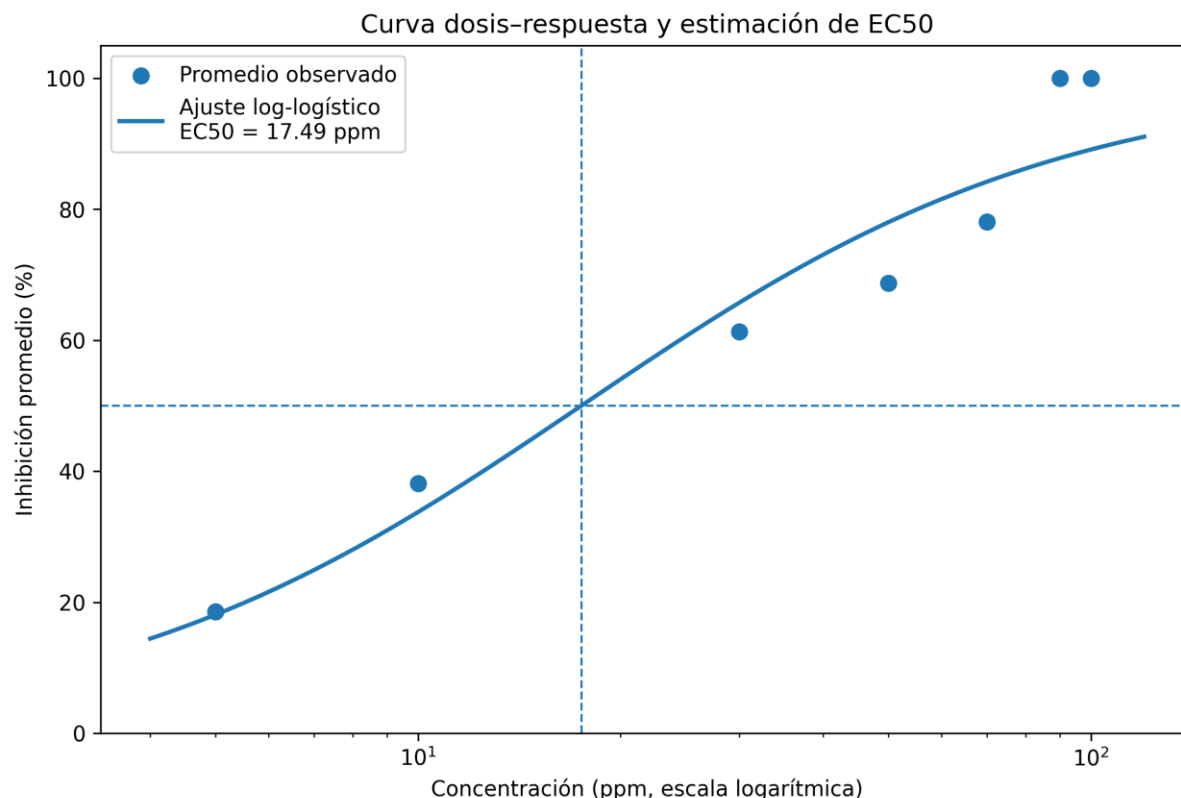


Figura 37. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica a partir de datos experimentales de inhibición micelial de *Neopestalotiopsis spp* tratados con la molécula sola 3 tienil 5 azido pirazol y estimación de IC_{50} (17.49 ppm).

La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas, $H(6) = 19.73$, $p = .003$. Además, la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia creciente significativa en el porcentaje de inhibición a medida que aumentó la concentración, $J = 184.50$, $p < .001$. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, el tratamiento evaluado mostró un efecto inhibitorio creciente sobre *Neopestalotiopsis* conforme aumentó la concentración. El ajuste de la curva dosis–respuesta estimó un IC_{50} de 17.49 ppm, lo que indica que dicha concentración produce aproximadamente 50% de inhibición del crecimiento. Desde una perspectiva biológica, los datos muestran un patrón dosis–dependiente: la inhibición aumenta desde 5 ppm hasta alcanzar 100% en las concentraciones de 90 y 100 ppm.

6.4 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Tebuconazol contra *Neopestalotipsis spp*

La combinación de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol con tebuconazol mostró una alta eficacia antifúngica frente a *Neopestalotipsis spp.* en condiciones *In vitro*, particularmente en las concentraciones medias y altas (cuadro 23).

Se observó una inhibición completa (100%) del crecimiento micelial en las concentraciones de 100, 90, 70 y 50 ppm, lo que indica un efecto altamente efectivo del tratamiento combinado. Este comportamiento sugiere una posible interacción favorable entre ambos compuestos, que permite mantener la actividad antifúngica incluso a concentraciones donde la molécula sola comenzaba a perder eficacia.

A partir de 30 ppm, la inhibición disminuyó a un promedio de 81.17%, aunque se mantiene en un rango alto. Posteriormente, a 10 ppm, el efecto antifúngico se redujo a 60.81%, mostrando una caída más marcada en la eficiencia del tratamiento.

Cuadro 23: Concentraciones en ppm de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con tres repeticiones

Concentración	Porcentaje de inhibición	Porcentaje de inhibición	Porcentaje de inhibición	Promedio
100 ppm	100	100	100	100
90 ppm	100	100	100	100
70 ppm	100	100	100	100
50 ppm	100	100	100	100
30 ppm	85.06	78.2	80.25	81.17
10 ppm	57.47	64.7	60.25	60.80
5 ppm	23	16.13	18.25	19.12

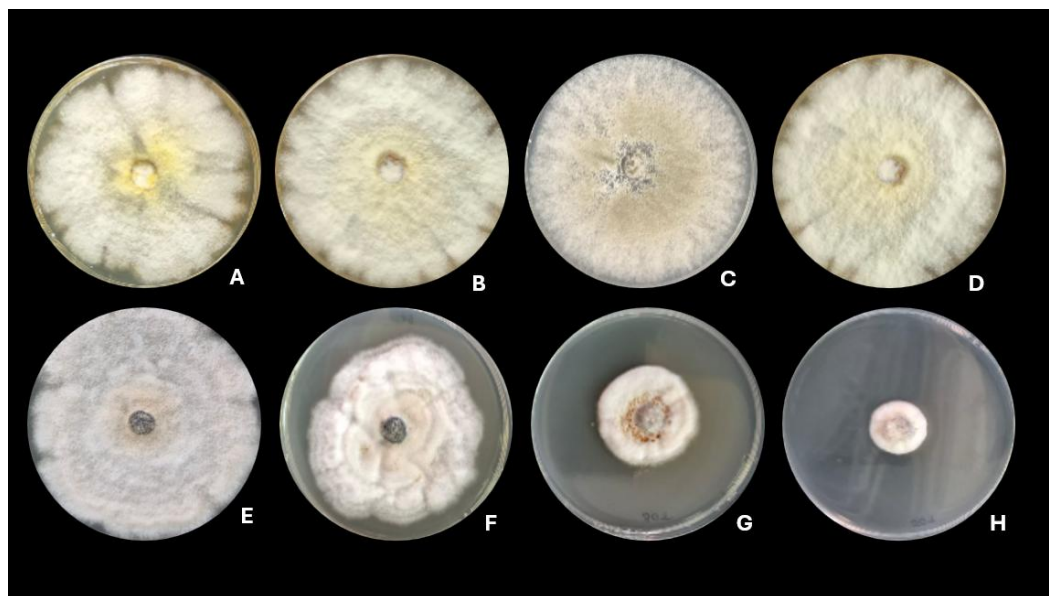


Figura 38: Crecimiento micelial de *Fusarium spp* en cajas Petri donde **A**=Testigo, **B** =9.9 mg ARP + 0.1 mg t, **C**= 8.91 mg ARP + 0.09 mg t, **D** 6.93 mg ARP + 0.07 mg t, **E**= 4.95 mg ARP+ 0.05 mg t **F**=2.97 mg ARP + 0.03 mg t **G**=0.99 mg AZP + 0.01 mg t **H**=0.48 mg AZP + 0.001 mg t.

Se aplicaron dos pruebas no paramétricas: Kruskal–Wallis para evaluar diferencias globales entre concentraciones y Jonckheere–Terpstra para evaluar una tendencia ordenada creciente.

Cuadro 24: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración

Prueba	n	Estadístico	gl	p	Conclusión
Kruskal–Wallis	21	H = 19.81	6	.003	Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas.
Jonckheere–Terpstra	21	J = 162.00	—	< .001	Se observó una tendencia creciente significativa del porcentaje de inhibición al aumentar la concentración.

Nota. Se analizaron siete concentraciones con tres réplicas por grupo (n total = 21). Para Jonckheere–Terpstra se asumió una alternativa creciente, coherente con la hipótesis de respuesta dosis–dependiente.

Se ajustó un modelo log-logístico de dos parámetros para estimar la concentración efectiva media (IC_{50}), entendida como la concentración necesaria para producir 50% de inhibición. El modelo estimó un IC_{50} de 9.06 ppm y una pendiente de 1.95. Este valor indica una actividad inhibitoria alta de la combinación molécula + tebuconazol contra *Neopestalotiopsis spp.*

6.4.1 Gráficos representativos

A continuación, se incluyen los gráficos elaborados para mostrar la distribución de los datos, la tendencia dosis–respuesta y la curva ajustada empleada para la estimación del IC_{50} .

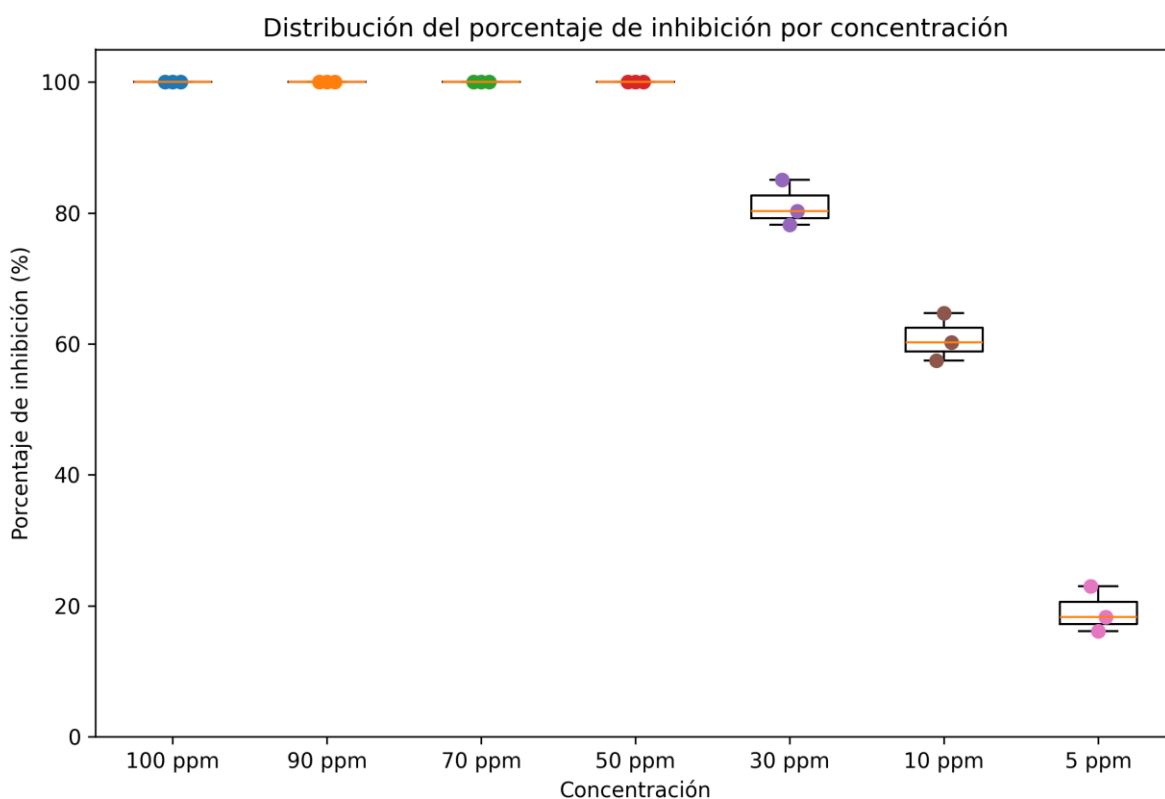


Figura 39. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con tebuconazol contra *Neopestalotiopsis spp.*

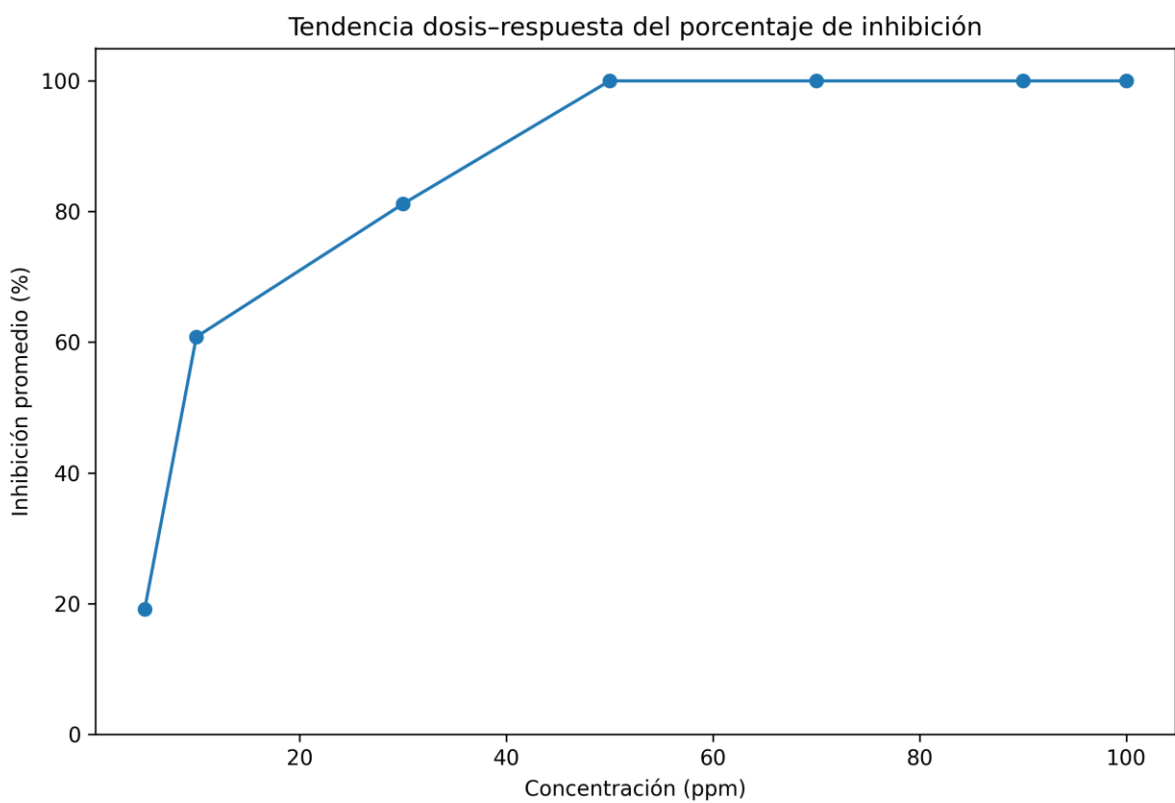


Figura 40. Tendencia dosis–respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con tebuconazol contra *Neopestalotiopsis* spp.

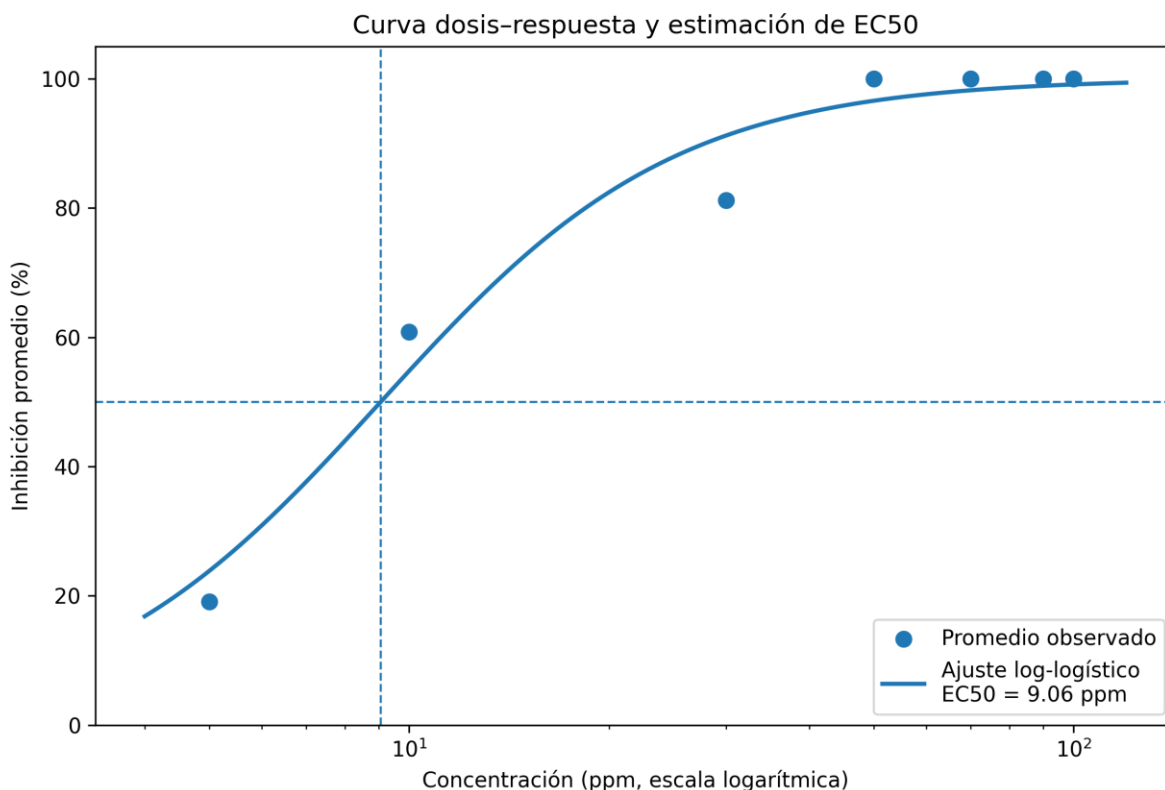


Figura 41. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica a partir de datos experimentales de inhibición micelial de *Neopestalotiopsis spp* tratados con la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con tebuconazol con una estimación de IC₅₀ (9.06 ppm).

La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas, $H(6) = 19.81$, $p = .003$. Además, la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia creciente significativa en el porcentaje de inhibición a medida que aumentó la concentración, $J = 162.00$, $p < .001$. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa la combinación de 3-tienil-5-azido pirazol con tebuconazol mostró un efecto inhibitorio creciente y marcado sobre *Neopestalotiopsis spp* conforme aumentó la concentración. El ajuste de la curva dosis–respuesta estimó un IC₅₀ de 9.06 ppm, lo que indica que dicha concentración produce aproximadamente 50% de inhibición del crecimiento. Desde una perspectiva biológica, los datos muestran un patrón consistente de respuesta dosis–dependiente: la inhibición aumenta de 5 a 30 ppm y luego se estabiliza en 100% a partir

de 50 ppm. Este comportamiento refuerza la interpretación de un efecto fuerte y sostenido de la combinación sobre el crecimiento del hongo.

6.5 Análisis de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con Nanopartículas de plata contra *Neopestalotipsis spp*

La combinación de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol con nanopartículas de plata presentó una respuesta antifúngica moderada frente a *Neopestalotipsis spp.* bajo condiciones *In vitro*, con una clara dependencia de la concentración (Cuadro 25).

En la concentración más alta evaluada (50 ppm), se obtuvo una inhibición promedio de 84.83%, lo que indica un efecto significativo sobre el crecimiento micelial del patógeno. Sin embargo, al disminuir la concentración a 10 ppm, la inhibición se redujo considerablemente a 41.71%, evidenciando una pérdida importante de eficacia. En la figura 42 se puede observar el crecimiento micelial de *neopestalotipsis spp* con nanopartículas de plata.

Cuadro 25: Concentraciones en ppm de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con tres repeticiones

Concentración	Porcentaje de inhibición	Porcentaje de inhibición	Porcentaje de inhibición	Promedio
50 ppm	82.61	85.57	84.09	84.83
10 ppm	40.07	42.25	41.16	41.705
5 ppm	17.36	20.23	18.795	19.5125
2.5 ppm	0	0	0	0
1 ppm	0	0	0	0

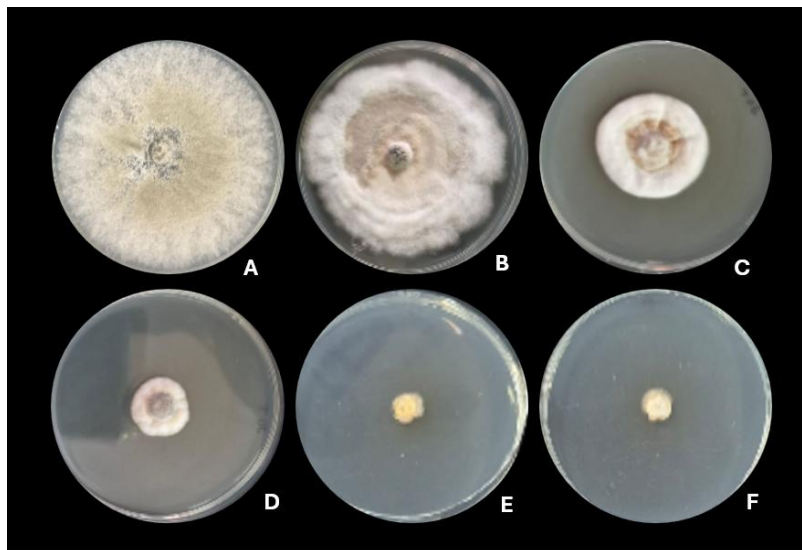


Figura 42: Crecimiento micelial de *Neopestalotiopsis spp* en cajas Petri donde A=Testigo, B=6.93 mg ARP + 2.5 ml Ag C=0.99 mg ARP + 0.5 ml Ag, D=0.48 mg ARP + 0.25 ml Ag, E=0.24 mg ARP + 0.175 ml Ag, G=0.09 mg ARP + 0.05 ml Ag, donde ARP= 3 tienil 5 azido pirazol y Ag = Nanopartículas de plata

Debido a la falta de normalidad en los residuales y a la presencia de valores nulos en las dosis bajas, se aplicaron dos pruebas no paramétricas: Kruskal–Wallis para evaluar diferencias globales entre concentraciones y Jonckheere–Terpstra para evaluar una tendencia ordenada creciente.

Cuadro 26: Resultados de las pruebas no paramétricas para evaluar diferencias y tendencia en el porcentaje de inhibición según la concentración

Prueba	n	Estadístico	gl	p	Conclusión
Kruskal–Wallis	15	H = 13.68	4	.008	Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas.
Jonckheere–Terpstra	15	J = 85.50	—	< .001	Se observó una tendencia creciente significativa del porcentaje de inhibición al aumentar la concentración.

Nota. Se analizaron cinco concentraciones con tres réplicas por grupo (n total = 15). Para Jonckheere–Terpstra se asumió una alternativa creciente, coherente con la hipótesis de respuesta dosis–dependiente.

Se ajustó un modelo log-logístico de dos parámetros para estimar la concentración efectiva media (IC_{50}), entendida como la concentración necesaria para producir 50% de inhibición. El modelo estimó un IC_{50} de 13.77 ppm y una pendiente de 1.51. Este valor indica una actividad inhibitoria moderada de la combinación molécula + nanopartículas de plata contra *Neopestalotiopsis spp.*

6.5.1 Gráficos representativos

A continuación, se incluyen los gráficos elaborados para mostrar la distribución de los datos, la tendencia dosis–respuesta y la curva ajustada empleada para la estimación del IC_{50} .

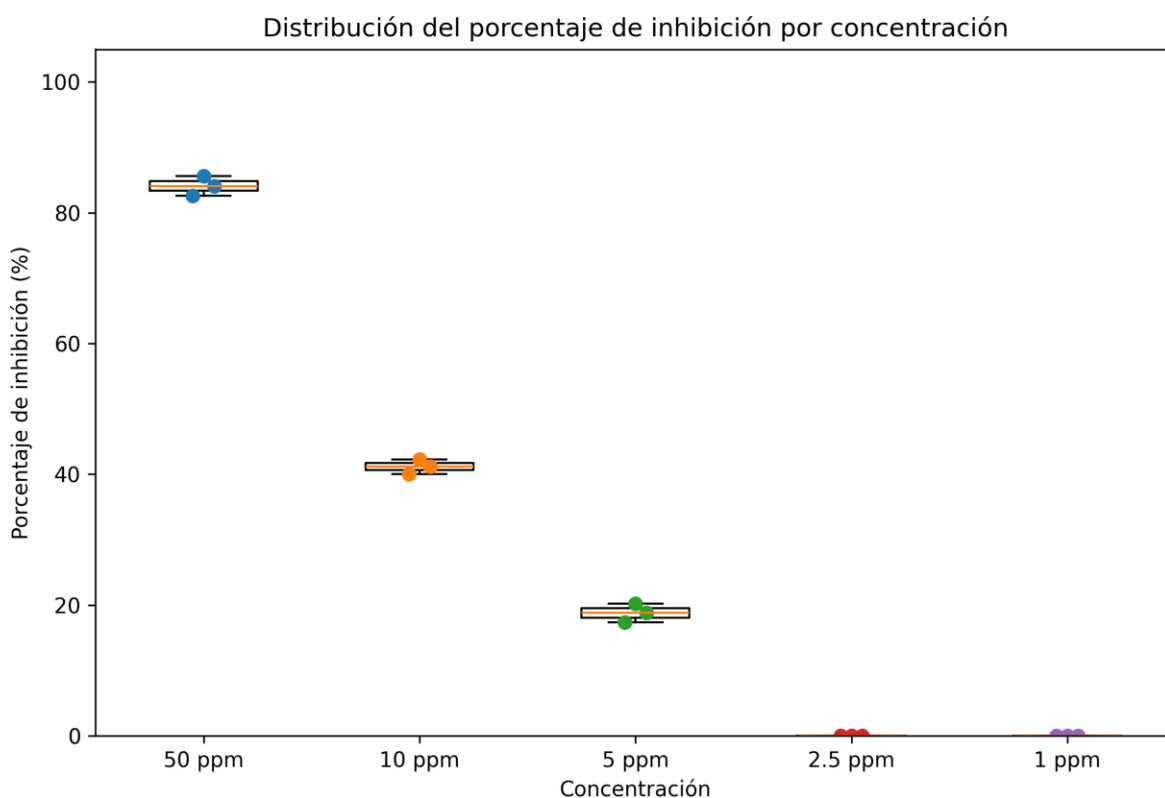


Figura 43. Distribución del porcentaje de inhibición por concentración de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con nanopartículas de planta contra *Neopestalotiopsis spp.*

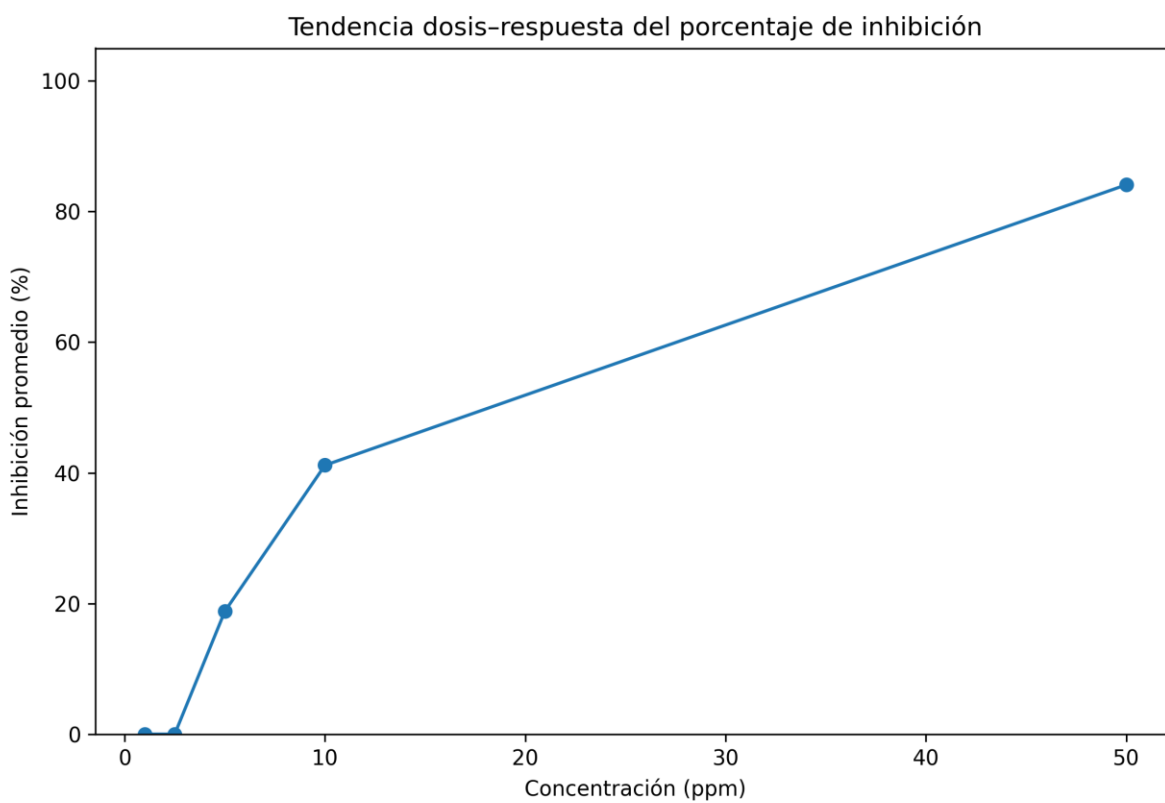


Figura 44. Tendencia dosis-respuesta del porcentaje de inhibición según la concentración de la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con nanopartículas de planta contra *Neopestalotiopsis spp.*

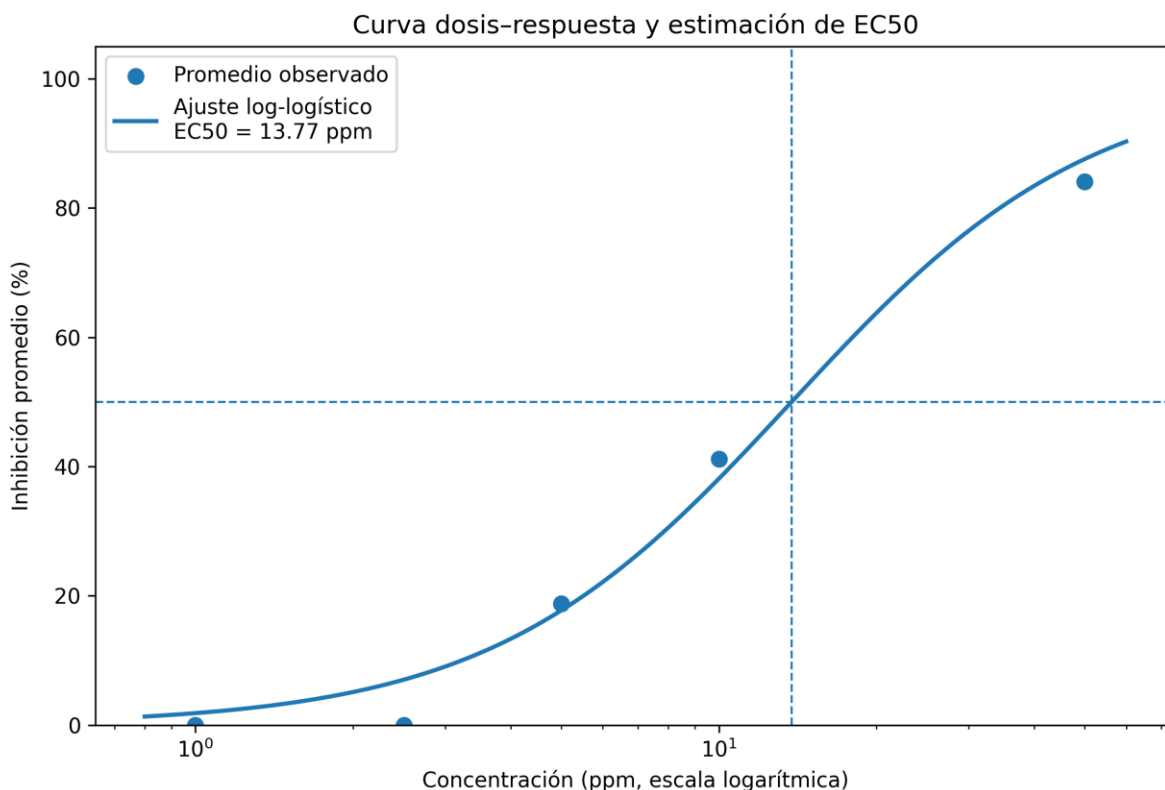


Figura 45. Curva dosis–respuesta en escala logarítmica a partir de datos experimentales de inhibición micelial de *Neopestalotiopsis spp* tratados con la molécula 3 tienil 5 azido pirazol con nanopartículas de plata con estimación de IC₅₀ (13.77 ppm).

La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas, $H(4) = 13.68$, $p = .008$. Además, la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia creciente significativa en el porcentaje de inhibición a medida que aumentó la concentración, $J = 85.50$, $p < .001$. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, la combinación de 3-tienil-5-azido pirazol con nanopartículas de plata mostró un efecto inhibitorio creciente y marcado sobre *Neopestalotiopsis spp* conforme aumentó la concentración. El ajuste de la curva dosis–respuesta estimó un IC₅₀ de 13.77 ppm, lo que indica que dicha concentración produce aproximadamente 50% de inhibición del crecimiento. Desde una perspectiva biológica, los datos muestran un patrón consistente de respuesta dosis–dependiente: no se observó inhibición en 1 y 2.5 ppm, se registró una inhibición baja en 5 ppm, intermedia en 10 ppm y mayor en 50 ppm. Este

comportamiento refuerza la interpretación de un efecto dependiente de la dosis de la combinación sobre el crecimiento del hongo.

6.6 Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo evidencian que la molécula 3-tienil-5-azido pirazol mantiene actividad antifúngica contra *Neopestalotiopsis spp.*, confirmando su efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial bajo condiciones *In vitro*. No obstante, a diferencia de los capítulos anteriores, donde se analizaron patógenos ampliamente estudiados, en este caso se trata de un patógeno emergente, lo que confiere un valor adicional a los resultados obtenidos.

La respuesta observada puede interpretarse considerando la biología y ecología de *Neopestalotiopsis spp.*, un género caracterizado por su alta capacidad de adaptación a condiciones ambientales, estas características favorecen su establecimiento y dificultan su dónde este patógeno puede persistir en residuos vegetales y suelo durante varias temporadas (Rebollar-Alviter et al., 2020; Baggio et al., 2021).

Neopestalotiopsis spp. depende en mayor medida de condiciones ambientales favorables para su proliferación. En este sentido, la eficacia observada del tratamiento podría estar relacionada con la capacidad del compuesto para interferir en etapas activas del crecimiento micelial, más que en estructuras de resistencia.

El comportamiento dosis–respuesta confirma que la actividad fungistática está directamente relacionada con la concentración del tratamiento, lo cual coincide con lo observado en capítulos previos, pero en este caso adquiere relevancia debido a la necesidad de controlar patógenos emergentes con alta capacidad de diseminación. La disminución de la inhibición a bajas concentraciones sugiere que el patógeno puede mantener su viabilidad bajo niveles subletales del compuesto, lo que resalta la importancia de definir dosis adecuadas en posibles aplicaciones futuras.

En cuanto a las combinaciones evaluadas, el incremento en la inhibición al emplear tebuconazol en conjunto con la molécula sugiere un efecto complementario, lo cual es

consistente con el uso de fungicidas sistémicos que actúan sobre la biosíntesis de ergosterol. Este resultado es particularmente relevante en el contexto de *Neopestalotiopsis spp.*, ya que el control químico convencional ha mostrado eficacia variable, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas más eficientes (Baggio et al., 2023).

Por otro lado, la respuesta observada con nanopartículas de plata confirma que su efecto fungistático también depende de la concentración. Sin embargo, la menor eficacia a bajas concentraciones sugiere que su aplicación aislada podría ser limitada frente a patógenos con alta capacidad de adaptación.

Desde el punto de vista estadístico, las diferencias significativas entre tratamientos y la tendencia creciente en la inhibición respaldan la validez de los resultados obtenidos. En conjunto, estos hallazgos indican que la molécula evaluada no solo es efectiva contra patógenos tradicionales, sino que también presenta actividad frente a patógenos emergentes, lo que amplía su potencial aplicación en el manejo fitosanitario.

6.7 Conclusión

La molécula 3-tienil-5-azido pirazol presentó actividad antifúngica contra *Neopestalotiopsis spp.* en condiciones *In vitro*, mostrando un efecto dependiente de la concentración.

A concentraciones altas, se alcanzaron inhibiciones cercanas al 100%, mientras que en concentraciones intermedias se registraron valores de inhibición entre aproximadamente 70 y 85%. En concentraciones bajas, la eficacia disminuyó notablemente, con valores inferiores al 50%, lo que confirma una relación dosis–respuesta clara.

Al combinarse con tebuconazol, la eficacia del tratamiento aumentó significativamente, lo que sugiere un efecto favorable entre ambos compuestos. Las concentraciones de 100, 90, 70 y 50 ppm presentaron una inhibición del 100 % del crecimiento micelial de *Neopestalotiopsis spp.*. A 30 ppm se obtuvo un promedio de inhibición de 81.17 %, mientras que a 10 ppm el valor fue de 60.80 %. La concentración de 5 ppm registró una inhibición de 19.12 %. Por otro lado, la combinación con nanopartículas de plata mostró

una actividad antifúngica dependiente de la concentración, alcanzando un promedio de inhibición de 84.83 % a 50 ppm, 41.70 % a 10 ppm y 19.51 % a 5 ppm, mientras que las concentraciones de 2.5 y 1 ppm no mostraron inhibición del crecimiento micelial.

Los análisis estadísticos realizados confirmaron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas ($p < 0.05$), observándose una tendencia creciente en el porcentaje de inhibición conforme aumentó la concentración de los tratamientos. La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias significativas entre tratamientos ($H = 13.68$; $p = .008$), mientras que la prueba de Jonckheere–Terpstra indicó una tendencia dosis–respuesta significativa ($J = 85.50$; $p < .001$). Además, el modelo log-logístico estimó un IC_{50} de 17.49 ppm para la molécula sola, 9.06 ppm para la combinación con tebuconazol y 13.77 ppm para la combinación con nanopartículas de plata, evidenciando una mayor eficacia del tratamiento combinado con tebuconazol. Estos resultados permitieron rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa, confirmando la actividad antifúngica de la molécula 3-tienil-5-azido pirazol contra *Neopestalotiopsis spp*

Literatura citada

- Amrutha P., Vijayaraghavan R. (2018). Evaluación de fungicidas y agentes de biocontrol contra *Neopestalotiopsis clavispora* que causa la tizón foliar de la fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.). Int. J. Curr. Microbiol. Ciencias de la Aplicación 7, 622–628. doi: 10.20546/ijcmas.2018.708.067
- Baggio J. S., Forcelini B. B., Wang N. Y., Ruschel R. G., Mertely J. C., Peres N. A. (2021). Brote de manchas foliares y podredumbre de frutos en la fresa de Florida causado por *Neopestalotiopsis spp*. Planta Dis. 105, 305–315. doi: 10.1094/PDIS-06-20-1290-RE, PMID:

- Baggio J., Forcelini B. B., Ruschel R. G., Mertely J. C., Peres N. (2019). Caracterización, patogenicidad y sensibilidad a fungicidas de *Pestalotiopsis* spp. en fresa en EE. UU.
- Chandana, R.; Poonacha, T.T.; Chethan, D.; Karan, R.; Kruthika, R.; Khan, F.; Ashwini, K.S.; Bevanur, A.; Vani, Y.; Ramesh, G.V.; et al. *Neopestalotiopsis rosae*, a novel pathogen causing leaf blight and crown rot of strawberries in India. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2024, 133, 102377. [CrossRef]
- Espinoza, J.G.; Briceño, E.X.; Keith, L.M.; Latorre, B.A. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Dis.* 2008, 92, 1407–1414.
- Goura K., El Alami N., Laasli S. E., Lahmamsi H., Kenfaoui J., Blibli I., et al. (2025). Cribado *In vitro* e inoculación en efecto invernadero de fungicidas candidatos para la inhibición de la germinación micelial y conidal de cuatro microorganismos aislados como agentes causales de enfermedades del tronco en manzanos. *Appl. Ciencia de la Fruta.* 67, 1–14. doi: 10.1007/S10341-025-01456-X
- Jevremović, D.; Vasić, T.; Živković, S.; Vasiljević, B.; Marić, M.; Vojvodić, M.; Bulajić, A. *Neopestalotiopsis clavispora*: A causal agent of twig dieback on highbush blueberries in Serbia. *J. Plant Dis. Prot.* 2022, 129, 1277–1283. [CrossRef]
- Rodríguez-Gálvez, E.; Hilário, S.; Lopes, A.; Alves, A. Diversity and pathogenicity of *Lasiodiplodia* and *Neopestalotiopsis* species associated with stem blight and dieback of blueberry plants in Peru. *Eur. J. Plant Pathol.* 2020, 157, 89–102. [CrossRef]
- Santos, J.; Hilário, S.; Pinto, G.; Alves, A. Diversity and pathogenicity of pestalotioid fungi associated with blueberry plants in Portugal, with description of three novel species of *Neopestalotiopsis*. *Eur. J. Plant Pathol.* 2022, 162, 539–555.
- VanHemelrijck, W.; Ceustermans, A.; VanCampenhout, J.; Lieten, P.; Bylemans, D. crown rot in strawberry caused by *Pestalotiopsis*. *Acta Hortic.* 2017, 1156, 781–785

Zuniga A. I., Baggio J. S., Peres N. A. (2024). Un medio semi-selectivo para evaluar la supervivencia durante el verano de *Neopestalotiopsis* sp. en campos de fresas de Florida. *Planta Dis.* 108, 2096–2103. doi: 10.1094/PDIS-11-23-2304-RE, PMID:

Zuniga, A.I.; Baggio, J.S.; Peres, N.A. Un medio semi-selectivo para evaluar la supervivencia durante el verano de *Neopestalotiopsis* sp. en campos de fresas de Florida. *Planta Dis.* **2024**, *108*, 2096–2103