

Análisis, restauración y conservación de Ecosistemas

Colección: CIENCIAS EXPERIMENTALES Y DE LA SALUD
Serie: 'Avances recientes'

Directora

M.^a ÁNGELES PEINADO HERREROS
Catedrática emérita de Biología Celular. Universidad de Jaén

Coordinadores para la serie Avances recientes
Ciencias de la tierra y del medioambiente

JUAN JIMÉNEZ MILLÁN
Catedrático de Universidad. Área de Cristalografía y Mineralogía. Universidad de Jaén

FRANCISCO JOSÉ GUERRERO RUIZ
Profesora Titular de Universidad. Área de Ecología. Universidad de Jaén

Comité Científico

ANTONIO SÁNCHEZ POZO
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada. España

BERNARDO HERRADÓN GARCÍA
Profesor de Investigación del CSIC. España

ALEJANDRA SIERRA LÓPEZ
Research Director. University of East. Finland

INMACULADA DE VICENTE ÁLVAREZ-MANZANEDA
Departamento de Ecología. Universidad de Granada. España

<https://editorial.ujaen.es/coleccion/ciencias-experimentales-serie-avances-recientes-en-ciencias-experimentales/>

Análisis, conservación y restauración de Ecosistemas

Francisco Guerrero y Francisco J. Márquez (eds.)



Análisis, conservación y restauración de ecosistemas /
Francisco Guerrero y Francisco J. Márquez (ed.lit.). –
Jaén : Editorial Universidad de Jaén, 2022. – (Ciencias
Experimentales y de la Salud. Avances Recientes ; 3)

352 p.; 17 x 24 cm

ISBN 978-84-9159-490-1

1. Ecosistemas-Gestión I. Guerrero, Francisco, ed.lit.. II.
Márquez, Francisco,J.,ed.lit. III. Jaén. Editorial Universidad
de Jaén, ed.

502.13

Esta obra ha superado la fase previa de evaluación externa realizada por pares mediante el sistema de doble ciego

COLECCIÓN: Ciencias experimentales y de la salud

Director: M.^a Ángeles Peinado Herreros

SERIE: *Avances recientes*, 3

Coordinadores de la serie: Juan Jiménez Millán y Francisco Guerrero Ruiz

© Autoras/es

© Universidad de Jaén

Primera edición, diciembre 2022

ISBN: 978-84-9159-490-1

ISBNe: 978-84-9159-491-8

Depósito Legal: J-711-2022

EDITA

Editorial Universidad de Jaén

Vicerrectorado de Proyección de la Cultura y Deporte

Campus Las Lagunillas, Edificio Biblioteca

23071 Jaén (España)

Teléfono 953 212 355

web: editorial.ujaen.es



editorial@ujaen.es

IMPRIME

Gráficas «La Paz» de Torredonjimeno, S. L.

Impreso en España/*Printed in Spain*

«Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, www.cedro.org) si necesita fotocopiar, escanear o hacer copias digitales de algún fragmento de esta obra».

Contenido

Estudio de la actividad de tres derivados pirimídicos: efecto antifúngico y fitotoxicidad.....	9
Introducción	11
Material y métodos	12
Resultados	16
Discusión.....	31
Conclusiones.....	37
Bibliografía.....	37
 Patrones de crecimiento radial en bosques de coníferas relictas de montaña en sus gradientes altitudinales de distribución. Un análisis retrospectivo de los efectos del cambio climático	43
Introducción	45
Material y métodos	51
Resultados y discusión	69
Conclusiones.....	77
Agradecimientos	79
Bibliografía.....	80
 El género <i>Eimeria</i> (Alveolata, Apicomplexa) en la provincia de Jaén: especies parásitas del conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	87
Introducción	89
El género <i>Eimeria</i>	96
Desarrollo experimental: detección de ooquistes de <i>Eimeria</i> en heces de conejo	103
Resultados	108
Discusión.....	117
Bibliografía	122
Anexo 1	130
Anexo 2	132
 El género <i>Agave</i> en el punto de mira: ¿invasión o desinformación en el contexto mediterráneo?	135
Introducción	137
Material y métodos	141
Resultados	143
Discusión.....	149
Conclusiones.....	158
Agradecimientos	159
Bibliografía.....	159

Variaciones intra e interanuales en el hidroperiodo de humedales del Alto Guadalquivir: evaluación mediante Sistemas de Información Geográfica y Teledetección	165
Introducción	167
Material y métodos	169
Resultados	181
Discusión.....	194
Conclusiones	200
Bibliografía.....	201
Recursos botánicos que utiliza la población del Corredor Seco de Guatemala: tablas de recursos y datos etnobotánicos	207
Introducción	209
Objetos e hipótesis.....	214
Material y métodos	215
Resultados	220
Discusión.....	237
Conclusiones	245
Agradecimientos	247
Bibliografía.....	247
Revisión actualizada del papel vectorial de las garrapatas en España. Un enfoque desde la Biología Molecular.....	253
Papel vectorial de las garrapatas	255
Desarrollo de estudios epidemiológicos	274
Un paso adelante: desarrollo de estudios con base genómica	276
Una mirada hacia el futuro.....	278
Bibliografía.....	278
Caracterización de las tipologías de manejo de las cubiertas herbáceas en el olivar de la Campiña y Sierra Sur de Jaén.....	305
Introducción	307
Antecedentes y marco teórico.....	307
Delimitación del problema y formulación de objetivos	311
Material y métodos	312
Resultados	318
Conclusiones.....	336
Líneas futuras de trabajo	337
Bibliografía.....	338
Relación de autores	341

Estudio de la actividad de tres derivados pirimidínicos: efecto antifúngico y fitotoxicidad

María del Pilar Cordovilla Palomares*, Ana Belén Quesada Miranda*,
Antonio Marchal Ingrain**

* Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén

** Departamento de Química Inorgánica y Orgánica. Universidad de Jaén

(mpilar@ujaen.es)

Resumen

Los cultivos están sujetos al ataque de hongos fitopatógenos que generan grandes pérdidas económicas. Por tanto, la búsqueda de soluciones para la protección de los cultivos es un campo de estudio prioritario. El objetivo de esta investigación fue evaluar la acción antifúngica de tres derivados pirimidínicos (4-amino-2,6-dimetoxi-5-nitrosopirimidina (P3), 3-[(6-amino-2-metoxi-5-nitrosopirimidin-4-il)amino] propanoato de etilo (P4c) y 2-amino-4,6-dimetoxi-5-nitrosopirimidina (P5)) y un fungicida comercial [Oxicloruro de Cobre (22%) + Mancozeb (17,5%)] sobre el crecimiento *in vitro* de patógenos que afectan a cultivos de gran interés agrícola. Los resultados indicaron un elevado efecto antifúngico de los derivados pirimidínicos. El derivado P3 fue el que mostró mayor actividad antifúngica en *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Veticillium dabliae* A112. En el caso de *V. dabliae* 2397 esto ocurrió con el derivado P5 y en *Pseudocercospora cladosporioides* con el fungicida comercial, aunque en ambos casos, estos principios activos estuvieron seguidos muy de cerca por el derivado P3.

Palabras clave: actividad antifúngica, concentración mínima inhibitoria, derivado pirimidínico, fitotóxico, hongos fitopatógenos.

Abstract

Crops are subject to attack by phytopathogenic fungi that cause large economic losses. Therefore, the search for solutions for crop protection is a priority field of study. The objective of this research was to evaluate the antifungal activity of three pyrimidine derivatives (4-amino-2,6-dimethoxy-5-nitrosopyrimidine (P3), ethyl 3 - ((6-amino-2-methoxy-5-nitrosopyrimidin-4-yl) amino) propanoate (P4c) and 2-amino-4,6-dimethoxy-5-nitrosopyrimidine) (P5) and a commercial fungicide {Copper oxychloride (22%) + Mancozeb (17.5%)} on the in vitro growth of pathogens of agricultural interest. The results indicated a high antifungal effect of the pyrimidine derivatives. The derivative P3 showed the highest antifungal activity on Alternaria sp., Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum and Veticillium dahliae A112. In V. dahliae 2397, the P5 derivative caused the highest growth inhibition, while in Pseudocercospora cladosporioides the commercial fungicide was the most effective. Also, in V. dahliae 2397 and P. cladorporioides, the P3 derivative followed in effectiveness the P5 derivative and the commercial fungicity.

Keywords: *antifungal activity, minimum inhibitory concentration, pyrimidinic derivative, phytotoxic, phytopathogenic fungi.*

Introducción

Los patógenos de las plantas son una parte integral de los agroecosistemas, continuamente en coevolución y cada vez más resistentes debido al cambio climático. Esto ha contribuido a que el rendimiento agrícola mundial disminuya drásticamente (Savary *et al.*, 2019). El manejo clásico de estos organismos se ha realizado a través de la obtención de plantas resistentes y por la aplicación de productos químicos. Sin embargo, estas estrategias, parcialmente eficaces, traen consigo la aparición de patógenos altamente resistentes que conducen a enfermedades con mayor incidencia, contaminación ambiental y degradación general de los agroecosistemas (Villa *et al.*, 2015). Otros factores que han contribuido a las enfermedades de las plantas son la amplia gama de plantas hospedadoras, la dispersión de los patógenos por el viento, la maquinaria agrícola, el manejo del agua, los cambios ambientales y el monocultivo intensivo de plantas genéticamente idénticas (Pan *et al.*, 2010).

Los hongos fitopatógenos son responsables, aproximadamente, del 70- 80% de las enfermedades de las plantas (Berendsen *et al.*, 2012). Estos reducen el rendimiento del cultivo y la calidad de los alimentos, suponiendo una limitación importante para una producción agrícola sostenible, especialmente en los sistemas de cultivo intensivo (Yang *et al.*, 2019). Por otra parte, las especies y abundancia de hongos fitopatógenos de la rizosfera cambian con las condiciones ambientales, lo que dificulta el control de las enfermedades (Pieterse *et al.*, 2016). Por tanto, ante a la grave amenaza de los cultivos causada por las enfermedades de las plantas, es importante desarrollar fungicidas respetuosos con el medioambiente y altamente efectivos frente a los patógenos.

En general, los fungicidas desarrollados recientemente son más seguros que los que tienen una larga historia. Sin embargo, ocasionalmente se han manifestado riesgos inesperados para la salud (Zhu *et al.*, 2010). Los compuestos heterocíclicos presentan elevado interés para uso farmacéutico y agroquímico. El núcleo de estos heterocíclicos está asociado con diferentes propiedades biológicas como pesticidas, insecticidas y fungicidas. Las pirimidinas, como compuestos heterocíclicos han sido objeto de estudio frente a bacterias y hongos patógenos de humanos (Olivella *et al.*, 2012, 2015). También hay estudios donde algunos derivados pirimidínicos han mostrado actividad frente a hongos fitopatógenos. El Mepanipyrim (2-amino-N-fenil-4-metil-6-(prop-1-inil)pirimidina) es una anilino pirimidina que controla eficazmente patógenos de las plantas tales como *Botrytis cinerea* (Nagata *et al.*, 2003; McQuilken y Thomson, 2008), considerado uno de los hongos fitopatógenos más importantes debido a las pérdidas económicas que genera en todo el mundo (Dean *et al.*, 2012; Jin y Wu, 2015).

Otras moléculas análogas (ciprodinil y el pirimetanil) también se utilizan en agricultura. Su modo de acción es la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos específicos y/o la inhibición del secuestro de proteínas (Miura y Maeno, 2007). En *Verticillium dahliae*, derivados pirimidínicos como las 5-nitrosopirimidinas ocasionaron inhibiciones del crecimiento de hasta un 60% (Cordovilla *et al.*, 2017). En el caso de *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Pseudocercospora cladosporioides*, no hay información bibliográfica sobre su respuesta frente a las pirimidinas.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad biológica de tres derivados pirimidínicos sintetizados en la Universidad de Jaén sobre el crecimiento de siete hongos fitopatógenos de interés agrícola.

Material y métodos

Principios activos

En el presente trabajo se ha estudiado la actividad biológica de tres derivados pirimidínicos sintetizados en el Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad de Jaén con rendimientos del orden del 70% (Marchal *et al.*, 2010). Estos derivados son: 4-amino-2,6-dimetoxi-5-nitrosopirimidina (P3), 3-[(6-amino-2-metoxi-5-nitrosopirimidin-4-il)amino] propanoato de etilo (P4c) y 2-amino-4,6-dimetoxi-5-nitrosopirimidina (P5) (Figura 1). Con la finalidad de comparar el efecto de estos derivados con un fungicida de uso agrícola también se utilizó CODIMUR-M® en todos los experimentos, cuya formulación incluye oxiclóruo de cobre (22%) y Mancozeb (17,5%). Este fungicida destinado a la pulverización foliar como método preventivo, estima una aplicación eficaz entre 400-600 g/hl de producto. En base a la riqueza en cobre, la aplicación en campo eficaz equivale a concentraciones entre 880-1320 µg/ml de cobre. A nivel experimental se aplicó una dilución del 75% realizándose los ensayos con los mismos niveles de concentración de cobre que los derivados pirimidínicos.

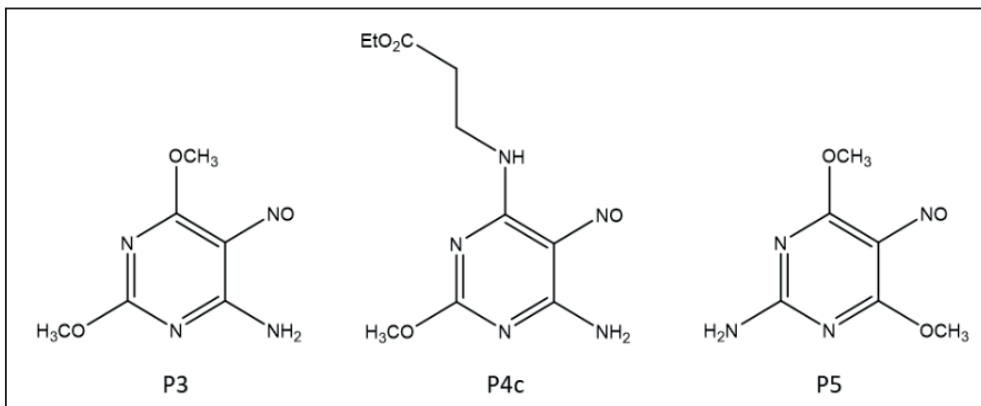


Figura 1. Derivados pirimidínicos 4-amino-2,6-dimetoxi-5-nitrosopirimidina (P3), 3-[(6-amino-2-metoxi-5-nitrosopirimidin-4-il)amino]propanoato de etilo (P4c) y 2-amino-4,6-dimetoxi-5-nitrosopirimidina (P5).

Material biológico

Los hongos fitopatógenos empleados pertenecen a la micoteca del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Jaén. *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* fueron aislados a partir de material vegetal enfermo (M.P. Cordovilla). La cepa CBS 113866 de *Pseudocercospora cladosporioides* pertenece a la colección Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Países Bajos). Los aislados 2397 (patotipo no defoliante, ND) y A112 (patotipo defoliante, D) de *Verticillium dahliae* fueron suministrados por el CSIC de Córdoba. Todos los hongos crecieron en medio Patata-dextrosa-Agar (VWR), excepto *Pseudocercospora cladosporioides* que creció en medio Avena-Agar.

Para los ensayos de fitotoxicidad se utilizó la variedad Grandes Lagos de California de *Lactuca sativa* (Fitó®).

Evaluación del efecto de los principios activos P3, P4c, P5 y un fungicida comercial [Oxicloruro de Cobre (22%) + Mancozeb (17,5%)] sobre el crecimiento fúngico

Se prepararon placas de Petri con medio adicionado del principio activo a distintas concentraciones (3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$). Para ello, se utilizaron soluciones concentradas de 25 mg/ml DMSO. También se prepararon placas control adicionadas de DMSO. A continuación, se sembraron discos de 0,5 cm de diámetro con crecimiento activo del hongo. Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad para todas las especies, excepto para *P. cladosporioides* que se incubó a 21°C. A partir de ese momento, se determinó el crecimiento (diámetro de la colonia) a intervalos de tiempo constantes hasta que el hongo acabó la fase de crecimiento lineal en DMSO (control).

La eficacia de los principios activos como fungicidas se calculó según Fawcett y Spenser (1970):

$$I = ((C-T) / C)100$$

Donde,

I = porcentaje de inhibición del crecimiento

C = diámetro de la colonia en el control (cm)

T = diámetro de la colonia en el principio activo (cm)

Estos datos se utilizaron para obtener la ecuación de regresión que nos permitió calcular la concentración mínima de principio activo que inhibe el crecimiento un 50% (MIC_{50}).

El ensayo estuvo bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial 4 x 8 x 3, es decir 4 principios activos (3 derivados pirimidínicos y fungicida comercial) ensayados a 8 concentraciones distintas (0, 3,9, 7,8, 15,6, 31,2, 62,5, 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$), con 3 repeticiones por concentración, lo que representó un total de 96 placas de Petri por hongo.

Evaluación del efecto de los principios activos P3, P4c, P5 y un fungicida comercial [Oxicloruro de Cobre (22%) + Mancozeb (17,5%)] sobre *L. sativa* var. Grandes Lagos de California

Para la evaluación del efecto de los principios activos sobre *L. sativa* se siguió el método descrito por Castillo (2004) y atendiendo a las recomendaciones de

la OCDE (2006). Se trata de un ensayo de biotoxicidad aguda, por lo que se recomiendan al menos 120 h (5 d) de exposición. En nuestro caso, la exposición fue de 240 h (10 d). Para ello, se realizó una curva dosis-respuesta con los principios activos a las mismas concentraciones que en la evaluación de la actividad antifúngica. El experimento se realizó en placas de Petri con un volumen final de 5 ml de agua destilada.

Las semillas se esterilizaron con etanol 70% durante 1 min y con lejía 20% durante 5 min. A continuación, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril (de 5 min). Seguidamente, se distribuyeron a razón de 10 semillas por placa de Petri y se incubaron durante 24 h en oscuridad; transcurrido ese tiempo se pasaron a la cámara de cultivo con las siguientes condiciones ambientales: fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, 25°C de temperatura, humedad relativa del 48% e intensidad luminosa de 48-50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la superficie de las placas, suministrada por 6 tiras LED de 8,1 A. Cada 24 h se evaluó la germinación hasta que al menos el 65% de las semillas en DMSO habían germinado y sus radículas mostraron una elongación de, al menos, 5 mm (Díaz *et al.*, 2013). La elongación del hipocotilo y radícula se determinó con un calibre digital (PCE instruments). Los datos se expresaron en porcentaje respecto al control (DMSO). Para calcular la inhibición de la germinación y/o elongación se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Inhibición de la germinación} = 100 \left(1 - \left(\frac{N.^{\circ} \text{ semillas germinadas en la dilución}}{N.^{\circ} \text{ semillas germinadas en el control}} \right) \right)$$

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento} = 100 \left(1 - \left(\frac{\text{Promedio de elongación en la dilución}}{\text{Promedio de elongación en el control}} \right) \right)$$

A partir de los datos obtenidos se calculó la concentración efectiva media (CE_{50}), es decir, la concentración de principio activo a la cual el parámetro fisiológico (germinación o crecimiento) disminuye un 50% respecto al control (Guo *et al.*, 2011).

Este ensayo también estuvo bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA), con un arreglo factorial 4 x 8 x 3, es decir 4 principios activos ensayados a 8 concentraciones distintas, con 3 repeticiones por concentración. Adicionalmente, se tuvo un tratamiento con agua destilada, también con 3 repeticiones, lo que hizo un total de 99 placas de Petri.

Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos durante la fase experimental se sometieron a un análisis de la varianza unifactorial y multifactorial. Cuando el valor P fue significativo ($P < 0,05$), las medias se compararon mediante el test de rango múltiple LSD, con un nivel de confianza del 95%.

El coeficiente de determinación de Ostle (η^2), se calculó para evaluar el efecto relativo de cada fuente de variación (principio activo y hongo) por separado y de su interacción, sobre los parámetros determinados (Ostle, 1963):

$$\eta^2 = (\text{suma de cuadrados de una fuente de variación}) / (\text{suma de cuadrados total})$$

Para la realización del estudio estadístico se utilizó el programa Statgraphics Centurion versión 15.2.06 (Universidad de Jaén).

Resultados

Efecto de los principios activos P3, P4c, P5 y un fungicida comercial [Oxicloruro de Cobre (22%) + Mancozeb (17,5%)] sobre el crecimiento fúngico

La velocidad de crecimiento fúngico en las placas control (DMSO) varió entre los hongos estudiados; *A. niger* fue el que antes alcanzó el máximo crecimiento (0,52 mm/h), seguido por *F. oxysporum* (0,44 mm/h), *B. cinerea* (0,41 mm/h), *Alternaria* (0,35 mm/h), *V. dahliae* 2397 (0,16 mm/h), *V. dahliae* A112 (0,11 mm/h) y *P. cladosporioides* (0,03 mm/h).

El análisis estadístico multifactorial nos permitió conocer cuál de las fuentes de variación (principio activo, hongo y su interacción) fue determinante en la inhibición del crecimiento fúngico. Según el coeficiente de determinación de Ostle (η^2), la principal fuente de variación fue la interacción (0,6711), seguida por el principio activo (0,2390) y el hongo (0,0747) (Tabla 1). Dicho análisis se realizó a una concentración de 62,5 $\mu\text{g/ml}$, mínima concentración a la que se obtuvo un 100% de inhibición para *P. cladosporioides*.

Estudio de la actividad de tres derivados pirimídicos
María del Pilar Cordovilla Palomares et al.

Tabla 1. Valor F (cociente del cuadrado medio entre-grupos e intra-grupos) y coeficiente de determinación de Ostle (η^2) de las fuentes de variación (principio activo, hongo e interacción) para la inhibición del crecimiento fúngico a 62,5 $\mu\text{g/ml}$ de los compuestos ensayados.

	Fuente de variación		
	Principio activo	Hongo	Interacción
Valor F	14.817,00*	4.630,83*	41.597,90*
η^2	0,2390	0,0747	0,6711

*diferencias significativas para $P < 0,05$

Efecto antifúngico a distintas concentraciones de derivado pirimidínico

En el control (DMSO) el máximo crecimiento de *Alternaria* se alcanzó a las 192 h. Durante ese tiempo, no se observó inhibición del crecimiento al 100% en ninguno de los principios activos (Tabla 2). La menor concentración de principio activo en la que hubo máxima inhibición del crecimiento fue 250 $\mu\text{g/ml}$ para P3 y P5 (90,92 y 65,13%, respectivamente), 125 $\mu\text{g/ml}$ para el fungicida comercial (cobre + mancozeb) (86,39%) y 62,5 $\mu\text{g/ml}$ para P4c (36,23%) (LSD; $P < 0,05$). Por tanto, en *Alternaria*, concentraciones superiores a 125 $\mu\text{g/ml}$ de cobre + mancozeb y 62,4 $\mu\text{g/ml}$ de P4c no mejoraron el efecto inhibidor del crecimiento. Por otra parte, a pesar de que el principio activo P4c fue el menos efectivo en el control de *Alternaria*, a concentraciones bajas (3,9 y 7,8 $\mu\text{g/ml}$) ejerció un efecto inhibidor superior al del fungicida comercial (cobre + mancozeb).

El análisis comparativo entre principios activos a 250 $\mu\text{g/ml}$ mostró que los valores más altos de inhibición del crecimiento de *Alternaria* se alcanzaron con el derivado P3 y cobre + mancozeb (90,92% y 88,54%, respectivamente), seguidos de P5 (65,13%) y P4c (43,63%) (Figura 2). Por tanto, en *Alternaria* el derivado P3 ejerció un efecto inhibidor del crecimiento similar al del cobre + mancozeb y un 28% y 52% superior al de los derivados P5 y P4c, respectivamente (LSD; $P < 0,05$).

Tabla 2. Inhibición del crecimiento (%) de *Alternaria*, tras 192 h, en PDA adicionado de distintos principios activos. El hongo también se cultivó en medio adicionado de DMSO (control). En cada columna las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

Concentración (µg/ml)	Principio activo			
	P3	P4c	P5	Cobre + mancozeb
3,9	34,79 e	22,13 c	10,91 f	12,34 f
7,8	38,38 e	24,04 c	13,30 f	18,31 e
15,6	48,65 d	27,63 c	21,89 e	38,14 d
31,2	58,68 c	29,30 bc	32,40 d	54,14 c
62,5	65,84 c	36,23 ab	43,63 c	77,31 b
125	77,55 b	39,09 a	53,90 b	86,39 a
250	90,92 a	43,63 a	65,13 a	88,54 a

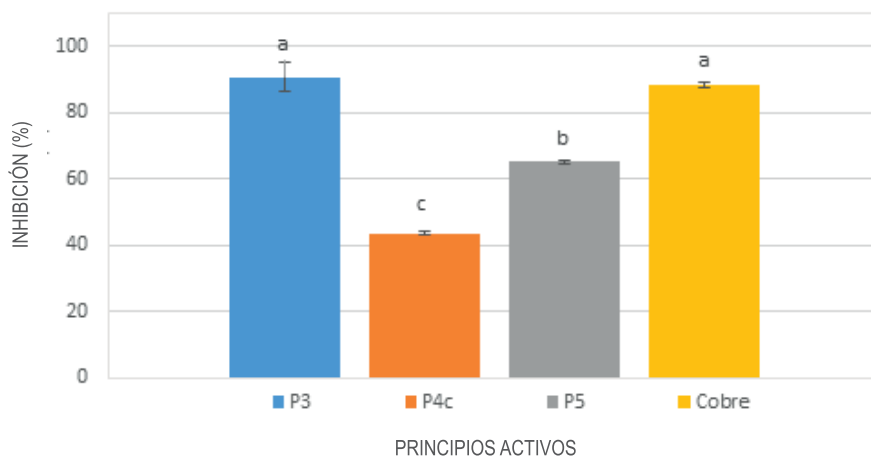


Figura 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Alternaria* respecto al control (DMSO) tras 192 h, en PDA adicionado de 250 µg/ml de principio activo. Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

En *A. niger*, la inhibición del crecimiento (144 h) a distintas concentraciones de principio activo se muestra en la **Tabla 3**. Como podemos observar, el

Estudio de la actividad de tres derivados pirimídicos
María del Pilar Cordovilla Palomares et al.

derivado P3 fue el único que inhibió el crecimiento un 100% a 125 µg/ml. En el resto de principios activos, la máxima inhibición se alcanzó con 62,5 µg/ml de cobre + mancozeb (29,53%) y 250 µg/ml de P4c y P5 (87,92 y 83%, respectivamente; $P < 0,05$). Con cobre + mancozeb se observaron los valores más bajos de inhibición en todas las concentraciones ensayadas; además, con 3,9 y 7,8 µg/ml no hubo inhibición. Por tanto, el fungicida comercial fue el menos efectivo en la inhibición del crecimiento de *A. niger*.

El estudio comparativo entre principios activos (LSD; $P < 0,05$; **Figura 3**) se realizó a 125 µg/ml (mínima concentración a la que se inhibió 100% el crecimiento en P3). La máxima inhibición del crecimiento de *A. niger* se obtuvo con el derivado P3 (100%), seguido por P4c y P5 (76,29% y 75,62%, respectivamente) y cobre + mancozeb (38,93%). En contraste con lo que ocurrió en *Alternaria*, donde el cobre + mancozeb fue igual de efectivo que el derivado P3, en *A. niger* la inhibición ocasionada por los principios activos P4c y P5 fue un 49% superior a la del cobre + mancozeb.

Tabla 3. Inhibición del crecimiento (%) de *A. niger*, tras 144 h, en PDA adicionado de distintos principios activos. El hongo también se cultivó en medio adicionado de DMSO (control). En cada columna las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

Concentración (µg/ml)	Principio activo			
	P3	P4c	P5	Cobre + mancozeb
3,9	25,50 f	9,17 e	11,41 g	0
7,8	40,27 e	13,65 e	28,41 f	0
15,6	64,21 d	19,69 e	40,49 e	17,90 c
31,2	75,84 c	35,57 d	52,80 d	23,27 bc
62,5	83,22 b	50,11 c	68,46 c	29,53 abc
125	100,00 a	76,29 b	75,62 b	38,93 ab
250	100,00 a	87,92 a	83,00 a	42,95 a

0, no hubo inhibición según el análisis estadístico

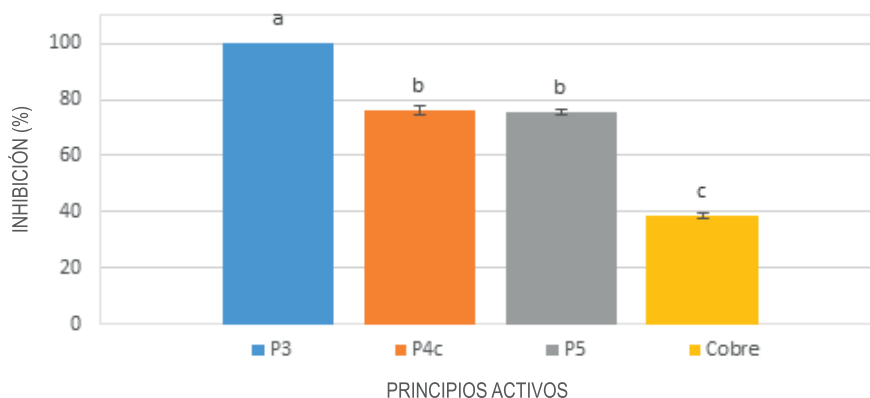


Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *A. niger* respecto al control (DMSO) tras 144 h, en PDA adicionado de 125 µg/ml de principio activo. Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

B. cinerea alcanzó el máximo crecimiento a las 168 h (DMSO). En P3, P4c y cobre + mancozeb no hubo descenso del crecimiento respecto al control con 3,9 µg/ml (Tabla 4). Además, con P4c y cobre + mancozeb, el descenso se detectó a partir de 15,6 y 31,2 µg/ml respectivamente ($P < 0,05$); en el caso del derivado P5, esto ocurrió a la concentración de 62,5 µg/ml. La máxima inhibición del crecimiento se alcanzó con 250 µg/ml en todos los derivados pirimidínicos, siendo esta del 100% en el derivado P3. En contraste a lo que ocurre con *A. niger*, en cobre + mancozeb el 100% de inhibición se observó con 125 µg/ml. Sin embargo, no tuvo efecto sobre el crecimiento a concentraciones inferiores a 31,2 µg/ml.

Dado que en *B. cinerea*, con 125 µg/ml se obtuvo un 100% de inhibición del crecimiento con cobre + mancozeb, la comparación entre principios activos se realizó a esta concentración (Figura 4) al igual que en *A. niger*. Con 125 µg/ml, el derivado P3 redujo el crecimiento fúngico un 37,18% menos que el cobre + mancozeb, aunque si lo comparamos con los otros derivados pirimidínicos, inhibió el crecimiento un 66% y 83% más que P4c y P5, respectivamente.

Estudio de la actividad de tres derivados pirimídicos
María del Pilar Cordovilla Palomares et al.

Tabla 4. Inhibición del crecimiento (%) de *B. cinerea*, tras 168 h, en PDA adicionado de distintos principios activos. El hongo también se cultivó en medio adicionado de DMSO (control). En cada columna las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

Concentración (µg/ml)	Principio activo			
	P3	P4c	P5	Cobre + mancozeb
3,9	0	0	-8,63 c	0
7,8	25,64 c	0	0	0
15,6	32,93 c	7,65 c	0	0
31,2	54,56 b	14,95 b	0	33,41 c
62,5	61,12 b	15,67 b	8,38 b	79,34b
125	62,82 b	21,02 a	10,57 b	100,00 a
250	100,00 a	22,48 a	52,37 a	100,00 a

0, no hubo inhibición según el análisis estadístico

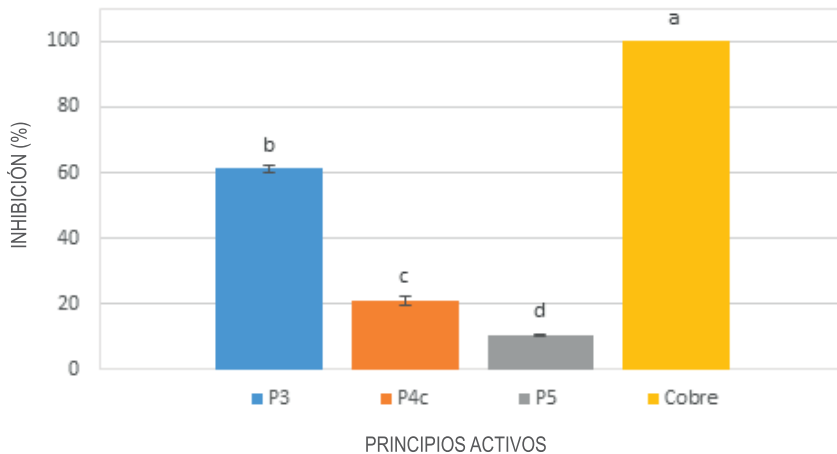


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* respecto al control (DMSO) tras 168 h, en PDA adicionado de 125 µg/ml de principio activo. Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

En *F. oxysporum*, a las 168 h de cultivo, con la concentración más baja, no hubo descenso del crecimiento ($P < 0,05$) en ningún principio activo (Tabla 5), al igual que ocurrió con 7,8 $\mu\text{g/ml}$ de P4c, P5 y cobre + mancozeb, y 15,6 $\mu\text{g/ml}$ de P5 ($P < 0,05$). En ninguna de las concentraciones se inhibió el crecimiento en su totalidad. Según el análisis estadístico, la máxima inhibición se obtuvo con 250 $\mu\text{g/ml}$ de P3 y cobre + mancozeb (84,29 y 80,42%, respectivamente) y 125 $\mu\text{g/ml}$ de P5 y P4c (71,09 y 64,04%, respectivamente).

Tabla 5. Inhibición del crecimiento (%) de *F. oxysporum*, tras 168 h, en PDA adicionado de distintos principios activos. El hongo también se cultivó en medio adicionado de DMSO (control). En cada columna las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Principio activo			
	P3	P4c	P5	Cobre + mancozeb
3,9	0	0	0	0
7,8	8,27 e	0	0	0
15,6	15,55 e	16,92 d	0	13,73 e
31,2	36,04 d	39,68 c	21,70 c	30,35 d
62,	46,05 c	50,38 bc	41,27 b	59,26 c
125	67,45 b	64,04 ab	71,09 a	73,60 b
250	84,29 a	72,69 a	78,38 a	80,42 a

0, no hubo inhibición según el análisis estadístico

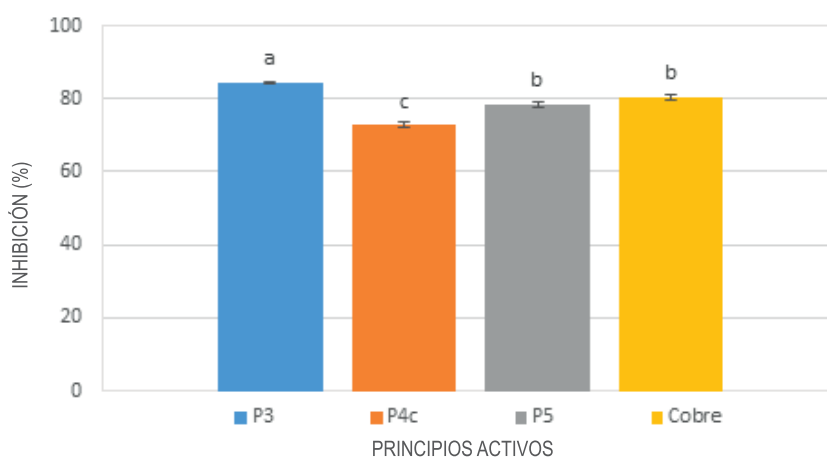


Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* respecto al control (DMSO) tras 168 h, en PDA adicionado de 250 $\mu\text{g/ml}$ de principio activo. Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

Estudio de la actividad de tres derivados pirimidínicos
María del Pilar Cordovilla Palomares et al.

La comparación de los derivados pirimidínicos (LSD; $P < 0,05$) a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, reveló que el crecimiento de en *F. oxysporum* (Figura 5) alcanzó su máxima inhibición con el derivado P3 (84,29%), seguido de cobre + mancozeb y P5 (80,42% y 78,38%, respectivamente) y P4c (72,69%). La inhibición detectada con P3 fue un 6% superior a alcanzada con P5 y cobre + mancozeb y un 7% superior a la alcanzada con P4c.

P. cladosporioides fue el hongo que mostró un crecimiento más lento. A los 91 d de incubación, en el derivado P3 y cobre + mancozeb no hubo inhibición del crecimiento a concentraciones de 3,9 y 7,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En el caso del derivado P5 esto ocurrió a concentraciones inferiores a 62,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y en P4c solo hubo inhibición significativa con 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Tabla 6). Además, con 3,9, 7,8, 15,6 y 31,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de P4c y, 3,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de P5, el crecimiento aumentó respecto al control ($P < 0,05$). Por otro lado, el hongo no creció a partir de 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de P3 y 62,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cobre + mancozeb. La inhibición total (100%) se alcanzó con 62,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cobre + mancozeb y 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de P3; en el resto de derivados pirimidínicos, la máxima inhibición ($P < 0,05$) se obtuvo con 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (68,32 y 5,69% para P5 y P4c, respectivamente).

Tabla 6. Inhibición del crecimiento (%) de *P. cladosporioides*, tras 91 d, en OA adicionado de distintos principios activos. El hongo también se cultivó en medio adicionado de DMSO (control). En cada columna las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Principio activo			
	P3	P4c	P5	Cobre + mancozeb
3,9	0	-8,66 b	-7,19 d	0
7,8	0	-8,66 b	0	0
15,6	6,68 d	-8,42 b	0	67,08 b
31,2	28,47 c	-8,17 b	0	72,03 b
62,5	67,82 b	0	8,42 c	100,0 a
125	100 a	0	32,67 b	100,0 a
250	100 a	5,69 a	68,32 a	100,0 a

0, no hubo inhibición según el análisis estadístico

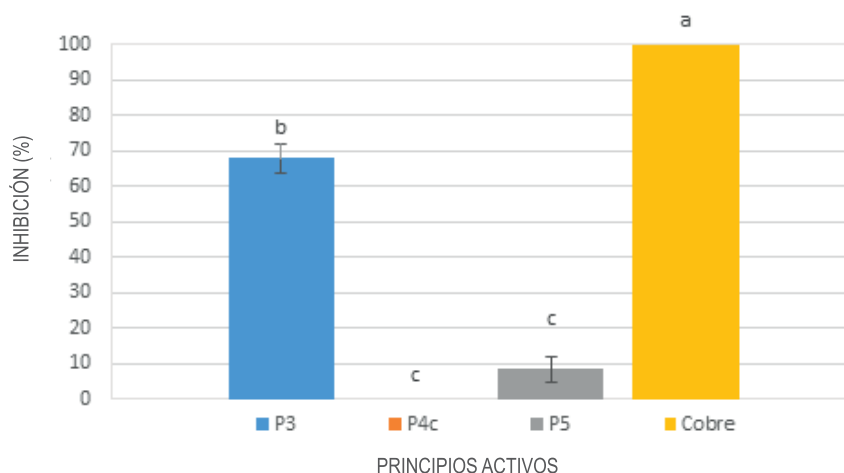


Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. cladosporioides* respecto al control (DMSO) tras 91 d, en OA adicionado de 62,5 µg/ml de principio activo. Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

En la **Figura 6** se compara la inhibición del crecimiento entre los principios activos para *P. cladosporioides* (LSD; $P < 0,05$) con 62,5 µg/ml (mínima concentración a la que se inhibió un 100% el crecimiento con cobre + mancozeb). La inhibición ocasionada por los derivados pirimidínicos fue mayor en P3 (67,82%), seguida de P5 (8,42%) y P4c donde no hubo inhibición. Es importante destacar que en P3 la inhibición fue un 88% mayor que en P5 y un 32,18% inferior que en cobre + mancozeb.

En la **Tabla 7** se representa la inhibición del crecimiento de *V. dahliae* A112 al final del cultivo (624 h) a las concentraciones ensayadas. El crecimiento en 3,9 µg/ml no descendió respecto al control ($P < 0,05$) en ninguno de los derivados pirimidínicos, así como con 7,8 µg/ml de P4c y cobre + mancozeb. La máxima inhibición se obtuvo con 250 µg/ml en todos los principios activos. A dicha concentración, el derivado que más inhibió fue P3 (92,74%), seguido de P5 (83,37%), cobre + mancozeb (74,71%) y P4c (66,05%) (LSD; $P < 0,05$). Por tanto, la inhibición producida por P3 fue 28,78% mayor que la obtenida por P4c, 19,44% mayor que la ocasionada por cobre + mancozeb y 9,75% a la de P5 (**Figura 7**). Además, el derivado P5 fue un 11,59% más efectivo que el cobre + mancozeb en la inhibición del crecimiento.

Estudio de la actividad de tres derivados pirimídicos
 María del Pilar Cordovilla Palomares et al.

Tabla 7. Inhibición del crecimiento (%) de *V. dahliae* A112, tras 624 h, en PDA adicionado de distintos principios activos. El hongo también se cultivó en medio adicionado de DMSO (control). En cada columna las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

Concentración (µg/ml)	Principio activo			
	P3	P4c	P5	Cobre + mancozeb
3,9	0	0	0	0
7,8	24,36 d	0	12,19 f	0
15,6	49,89 c	9,61 d	22,72 e	16,63 c
31,2	52,70 c	11,95 d	33,73 d	21,32 bc
62,5	55,74 c	32,79 c	57,85 c	24,36 bc
125	73,07 b	52,23 b	73,30 b	35,84 b
250	92,74 a	66,05 a	83,37 a	74,71 a

0, no hubo inhibición según el análisis estadístico

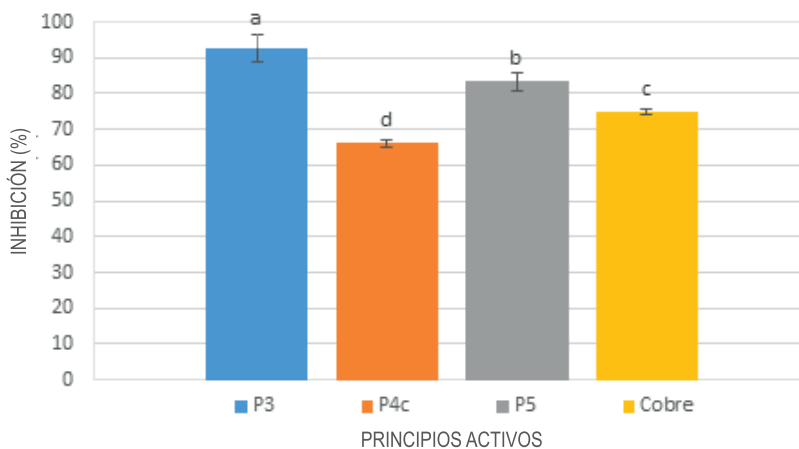


Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *V. dahliae* A112 respecto al control (DMSO) tras 624 h, en PDA adicionado de 250 µg/ml de principio activo. Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

El máximo valor de crecimiento lineal de *V. dahliae* 2397 en el control se alcanzó a las 432 h. La comparación de las medias mostró que con 3,9 µg/ml de P4c y cobre + mancozeb no se detectaron diferencias respecto al control ($P < 0,05$; **Tabla 8**). Por otro lado, con cobre + mancozeb no hubo diferencias significativas entre 7,8, 15,6, 31,2 y 62,5 µg/ml. Una inhibición del 100% se alcanzó con 250 µg/ml de P5. La máxima inhibición alcanzada en el resto de

compuestos fue 93,87% para el derivado P3, 88,69% para cobre + mancozeb y 79,26% para el derivado P4c (Figura 8). En este caso, la inhibición producida por el derivado P5 fue 6, 11 y 21% mayor que la ocasionada por P3, cobre + mancozeb y P4c, respectivamente. La inhibición ocasionada por P3 fue 16% mayor que con P4c y 6% mayor que con cobre + mancozeb.

Tabla 8. Inhibición del crecimiento (%) de *V. dahliae* 2397, tras 432 h, en PDA adicionado de distintos principios activos. El hongo también se cultivó en medio adicionado de DMSO (control). En cada columna las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

Concentración (µg/ml)	Principio activo			
	P3	P4c	P5	Cobre + mancozeb
3,9	7,38 g	0	15,87 e	0
7,8	42,73 f	3,61 f	67,71 d	9,98 d
15,6	48,86 e	14,22 e	71,01 d	12,10 cd
31,2	54,52 d	28,12 d	79,87 c	12,33 cd
62,5	79,50 c	45,33 c	86,10 b	14,70 c
125	86,57 b	60,17 b	90,34 b	68,89 b
250	93,87 a	79,26 a	100,00 a	88,69 a

0, no hubo inhibición según el análisis estadístico

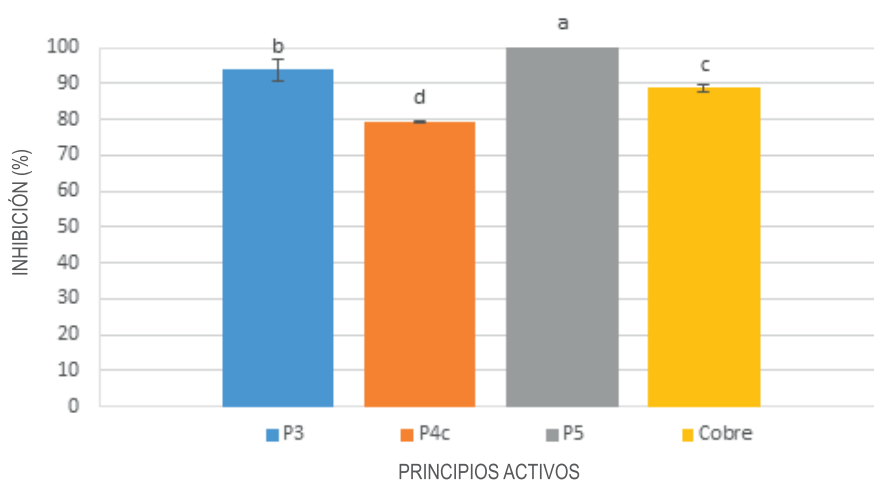


Figura 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *V. dahliae* 2397 respecto al control (DMSO) tras 432 h, en PDA adicionado de 250 µg/ml de principio activo. Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

Mínima concentración inhibitoria del crecimiento al 50%

En *Alternaria*, *B. cinerea*, y *P. cladosporioides* no se calculó MIC_{50} para el derivado P4c, dado que la inhibición del crecimiento fúngico en dicho derivado no llegó al 50% con la máxima concentración ensayada (250 $\mu\text{g/ml}$). En consecuencia, *Alternaria*, *B. cinerea* y *P. cladosporioides* fueron los menos sensibles al derivado P4c (Tabla 9). En el resto de hongos, el derivado P4c mostró su mayor efectividad en *A. niger*, donde serían necesarios 47,50 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir el crecimiento un 50%, seguido de *F. oxysporum* (60,83 $\mu\text{g/ml}$), *V. dahliae* 2397 (74,31 $\mu\text{g/ml}$) y *V. dahliae* A112 (160,16 $\mu\text{g/ml}$).

En lo que respecta al derivado P5, *V. dahliae* 2397 fue el hongo más sensible, ya que mostró el MIC_{50} más bajo (6,94 $\mu\text{g/ml}$). En el resto de hongos, MIC_{50} para P5 fue 28,68 $\mu\text{g/ml}$ en *A. niger*; 48,56 $\mu\text{g/ml}$ en *V. dahliae* A112, 73,84 $\mu\text{g/ml}$ en *F. oxysporum*, 98,50 $\mu\text{g/ml}$ en *Alternaria*, 143,83 $\mu\text{g/ml}$ en *P. cladosporioides* y 191,71 $\mu\text{g/ml}$ en *B. cinerea*. Por tanto, al igual que ocurre para el derivado P4c, los hongos que necesitarían mayores cantidades de P5 para inhibir su crecimiento serían *Alternaria*, *B. cinerea*, y *P. cladosporioides*.

De forma similar a lo que ocurrió para el derivado P4c, el valor más bajo de MIC_{50} para P3 se obtuvo en *A. niger* (10,79 $\mu\text{g/ml}$), seguido de *Alternaria* (18,06 $\mu\text{g/ml}$), *V. dahliae* 2397 (19,65 $\mu\text{g/ml}$), *V. dahliae* A112 2 (29,95 $\mu\text{g/ml}$), *B. cinerea* (30,64 $\mu\text{g/ml}$), *P. cladosporioides* (34,32 $\mu\text{g/ml}$) y, finalmente, *F. oxysporum* (56,51 $\mu\text{g/ml}$). En consecuencia, *A. niger* fue el hongo más sensible a la presencia del derivado P3 en el medio de crecimiento, mientras que *F. oxysporum* fue el menos sensible.

En *A. niger* no se calculó MIC_{50} para cobre + mancozeb, dado que la inhibición del crecimiento fúngico en dicho derivado no llegó al 50% con 250 $\mu\text{g/ml}$. En contraste, *P. cladosporioides* fue el hongo más sensible al fungicida comercial (cobre + mancozeb) con un valor de MIC_{50} de 15,38 $\mu\text{g/ml}$. Este valor fue de 26,27 $\mu\text{g/ml}$ para *Alternaria*, 35,18 $\mu\text{g/ml}$ para *B. cinerea*, 56,74 $\mu\text{g/ml}$ para *F. oxysporum*, 57,25 $\mu\text{g/ml}$ para *V. dahliae* 2397 y 160,70 $\mu\text{g/ml}$ para *V. dahliae* A112. En consecuencia, los hongos que menos inhibieron su crecimiento en presencia de cobre + mancozeb fueron *A. niger* y *V. dahliae*.

Tabla 9. Pendiente, intercepto y coeficiente de determinación de la ecuación asociada a la recta de crecimiento de *Alternaria*, *A. niger*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. cladosporioides*, *V. dahliae* A122 y *V. dahliae* 2397 a distintas concentraciones de principio activo (3,9-250 µg/ml). MIC₅₀ es la mínima concentración inhibitoria al 50. Se presentan valores medios seguidos por el error estándar.

Principio activo	MIC ₅₀ ± EE	Pendiente ± EE	Intercepto ± EE	R ²
<i>Alternaria</i>				
P3	18,06 ± 1,75	12,99 ± 1,23	14,56 ± 4,58	0,9237
P4c	-	-	-	-
P5	98,50 ± 3,49	13,55 ± 0,74	-12,20 ± 2,74	0,9730
Cobre + mancozeb	26,27 ± 0,76	20,80 ± 0,98	-17,98 ± 3,63	0,9796
<i>A. niger</i>				
P3	10,79 ± 1,20	18,64 ± 1,06	5,72 ± 3,93	0,9707
P4c	47,50 ± 3,40	20,28 ± 1,31	-28,26 ± 4,85	0,9627
P5	28,68 ± 0,76	17,36 ± 0,62	-8,29 ± 2,30	0,9888
Cobre + mancozeb	-	-	-	-
<i>B. cinerea</i>				
P3	30,64 ± 4,37	18,26 ± 2,06	-12,48 ± 7,63	0,8977
P4c	-	-	-	-
P5	191,71 ± 13,08	0,22 ± 0,01	-6,67 ± 1,52	0,9636
Cobre + mancozeb	35,18 ± 2,02	28,96 ± 2,21	-53,12 ± 8,20	0,9489
<i>F. oxysporum</i>				
P3	56,51 ± 1,39	21,11 ± 0,82	-35,15 ± 3,04	0,9860
P4c	60,83 ± 0,76	18,82 ± 0,95	-27,32 ± 3,53	0,9765
P5	73,84 ± 2,73	20,51 ± 1,59	-38,42 ± 5,89	0,9475
Cobre + mancozeb	56,74 ± 1,61	21,98 ± 2,08	-38,26 ± 7,72	0,9783
<i>P. cladosporioides</i>				
P3	34,32 ± 0,55	27,79 ± 1,88	-49,42 ± 6,99	0,9590
P4c	-	-	-	-
P5	143,83 ± 25,05	0,28 ± 0,01	-078 ± 1,05	0,9894
Cobre + mancozeb	15,38 ± 1,21	26,35 ± 2,78	-26,11 ± 10,31	0,9087
<i>V. dahliae</i> A112				
P3	29,95 ± 1,37	18,60 ± 1,28	-13,23 ± 4,72	0,9583
P4c	160,16 ± 23,14	16,01 ± 1,31	-30,54 ± 4,84	0,9422
P5	48,56 ± 1,01	20,41 ± 0,85	-29,23 ± 3,16	0,9838
Cobre + mancozeb	160,79 ± 4,29	0,26 ± 0,02	7,52 ± 2,18	0,9495
<i>V. dahliae</i> 2397				
P3	19,65 ± 0,75	19,46 ± 1,23	-7,89 ± 4,56	0,9642
P4c	74,31 ± 1,54	19,88 ± 0,73	-35,64 ± 2,72	0,9873
P5	6,94 ± 0,24	16,10 ± 2,08	17,57 ± 7,70	0,8719
Cobre + mancozeb	57,25 ± 0,76	21,92 ± 1,20	-38,72 ± 4,47	0,9725

-, inhibición inferior al 50%

Efecto de P3, P4c, P5 y un fungicida comercial [Oxicloruro de Cobre (22%) + Mancozeb (17,5%)] sobre *L. sativa* var. Grandes Lagos de California

El estudio de las propiedades fitotóxicas de los compuestos estudiados se evaluó en los procesos de germinación y crecimiento de las plántulas (elongación) hasta 240 h.

La germinación y elongación de las plantas se inhibió con todos los principios activos ensayados (Tabla 10). En presencia del derivado P3, la máxima inhibición de la germinación se alcanzó con 62,5 µg/ml, mientras que en la elongación esto ocurrió a la siguiente concentración ensayada (125 µg/ml). Resultados similares se obtuvieron para el derivado P5 y fungicida comercial (cobre + mancozeb). En contraste, en el derivado P4c la máxima inhibición de la elongación y germinación se obtuvieron con 62,5 µg/ml y 250 µg/ml, respectivamente.

Tabla 10. Inhibición de la germinación (%) y elongación (%) de *L. sativa*, tras 240 h, en H₂O adicionada de distintos principios activos. El hongo también se cultivó en medio adicionado de DMSO (control). En cada columna las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

Concentración (µg/ml)	Principio activo			
	P3	P4c	P5	Cobre + mancozeb
	Germinación			
3,9	0	0	0	0
7,8	20,00 c	0	0	0
15,6	33,33 c	0	0	0
31,2	60,00 b	0	16,67 b	0
62,5	80,00 ab	23,33 b	33,33 b	20,00 a
125	93,33 a	33,33 b	60,00 a	20,00 a
250	96,67 a	70,00 a	70,00 a	23,33 a

Tabla 10 (cont.). Inhibición de la germinación (%) y elongación (%) de *L. sativa*, tras 240 h, en H₂O adicionada de distintos principios activos. El hongo también se cultivó en medio adicionado de DMSO (control). En cada columna las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P < 0,05$).

Concentración (µg/ml)	Principio activo			
	P3	P4c	P5	Cobre + mancozeb
	Elongación			
3,9	0	0	0	0
7,8	0	0	0	0
15,6	0	0	0	0
31,2	51,17 b	0	0	45,98 b
62,5	68,66 b	44,28 a	60,83 b	48,33 b
125	98,34 a	47,07 a	64,97 b	56,24 ab
250	100,00 a	50,72 a	100,00 a	66,07 a

0, no hubo inhibición según el análisis estadístico

La concentración de principio activo que inhibe un 50% la germinación (EC_{50}) de *L. sativa* fue 25,19 µg/ml, 105,98 µg/ml y 181,44 µg/ml para P3, P5 y P4c, respectivamente (Tabla 11). En el caso de la elongación, la concentración efectiva media que causa una inhibición de la elongación del 50% (EC_{50}) fue 18,78 µg/ml para P3, 46,25 µg/ml para P5, 63,71 µg/ml para cobre + mancozeb y 152,98 µg/ml para P4c. En consecuencia, tanto germinación como crecimiento de *L. sativa* fueron más sensibles a la presencia del derivado P3 que al resto de principios activos. El derivado pirimidínico P4c fue el que menos afectó a la elongación (Tabla 11).

Estudio de la actividad de tres derivados pirimídicos María del Pilar Cordovilla Palomares *et al.*

Tabla 11. Pendiente, intercepto y coeficiente de determinación de la ecuación asociada a la recta de germinación y elongación de plántulas de *L. sativa* a distintas concentraciones de principio activo (3,9-250 µg/ml). EC₅₀ es la mínima concentración inhibitoria al 50%. Se presentan valores medios seguidos por el error estándar.

Principio activo	EC ₅₀ ± EE	Pendiente ± EE	Intercepto ± EE	R ²
Germinación				
P3	25,19 ± 2,22	24,38 ± 1,80	-28,64 ± 6,66	0,9867
P4c	181,55 ± 15,29	0,26 ± 0,01	3,17 ± 1,17	0,9960
P5	105,98 ± 9,25	16,82 ± 2,45	-28,85 ± 9,09	0,9508
Cobre + mancozeb	-	-	-	-
Elongación				
P3	18,78 ± 3,43	18,69 ± 2,09	-3,41 ± 7,75	0,8989
P4c	152,98 ± 20,08	15,68 ± 2,61	-32,14 ± 9,67	0,8097
P5	46,25 ± 3,74	23,41 ± 1,67	-39,66 ± 6,21	0,9547
Cobre + mancozeb	63,71 ± 6,03	14,32 ± 1,57	-10,69 ± 5,81	0,9028

-, inhibición inferior al 50%

Discusión

Efecto sobre el crecimiento fúngico

Los compuestos heterocíclicos presentan gran interés como fuente de nuevas estructuras químicas con potencial uso farmacológico y agroquímico. Las pirimidinas, como compuestos heterocíclicos han sido objeto de estudio frente a patógenos de humanos y plantas (McQuilken y Thomson, 2008; Olivella *et al.*, 2012, 2015). El desarrollo de métodos sintéticos para la producción de fungicidas o herbicidas a partir del núcleo de pirimidina podría proporcionar herramientas interesantes para el control de enfermedades de las plantas. En lo que respecta a su potencial como fungicida, en este trabajo se ha evaluado el efecto de tres derivados pirimidínicos, además de un fungicida comercial, sobre el crecimiento de siete hongos fitopatógenos (*Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Pseudocercospora cladosporioides*, *Verticillium dahliae* A112 y *Verticillium dahliae* 2397). En general, los derivados

pirimidínicos inhibieron el crecimiento fúngico en función de la dosis. Ninguno de los derivados, ni el fungicida comercial, ocasionó un 100% de inhibición en *Alternaria*, *F. oxysporum* y *V. dahliae* A112. En *Alternaria*, la inhibición del derivado P3 y el fungicida comercial fue similar ($\approx 89,73\%$). Dicha inhibición fue superior a la descrita por Xie *et al.* (2021); estos autores, utilizando extractos crudos proteicos de la raza LZ88 de *Bacillus siamensis* consiguieron inhibir un 65,10% el crecimiento de *A. alternata*. Esta inhibición fue similar a la obtenida con 62,5 $\mu\text{g/ml}$ del derivado P3 y con 250 $\mu\text{g/ml}$ del P5.

En *F. oxysporum* y *V. dahliae* A112, la mayor inhibición se obtuvo con el derivado P3 a 250 $\mu\text{g/ml}$ (84,29 y 92,74%, respectivamente). En el caso de *F. oxysporum*, estas inhibiciones superaron las descritas por Kong *et al.* (2020) utilizando compuestos difusibles y volátiles producidos por *Pseudomonas* sp. ST-LTJ4 (41,11-40,4%, respectivamente). Además, en estudios realizados por Li *et al.* (2021) con 200 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *Streptomyces* sp. H4 consiguieron inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* un 67,67%, inhibición similar a la conseguida para *F. oxysporum* con 125 $\mu\text{g/ml}$ de los derivados pirimidínicos P3, P4c y P5. Por otra parte, con el fungicida Tiabendazol (600 ppm) se obtuvieron inhibiciones del 100% en *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (López *et al.*, 2005), mientras que, con el fungicida comercial nuestros resultados revelaron una inhibición de *F. oxysporum* inferior (80,42%).

Los aislados de *V. dahliae* estudiados en el presente trabajo no tuvieron el mismo comportamiento frente a los derivados pirimidínicos. Así, el aislado defoliante (D) A112 fue más sensible al derivado P3 que al derivado P5, mientras que, en el aislado no defoliante (ND) 2397 ocurrió a la inversa. Sin embargo, los valores de inhibición siempre fueron inferiores en el patotipo D. Resultados similares fueron descritos por otros autores. Carrero *et al.* (2016) confirmaron que extractos de *Trichoderma asperellum* redujeron más el crecimiento de aislados ND que D de *V. dahliae*. En contraste, en estudios realizados por Varo *et al.* (2017), utilizando extractos de plantas frente a distintos aislados de *V. dahliae*, el aislado D mostró más sensibilidad que el ND. Estos mismos autores, con extractos de ajo (Bio 125®, Agromed S.L.), obtuvieron una inhibición del crecimiento del 50% y casi del 40% para aislados D y ND, respectivamente. Inhibiciones similares se presentan en este trabajo a concentraciones bajas del derivado P3; con 31,2 $\mu\text{g/ml}$ la inhibición fue del 52,70% para el aislado D y con 7,8 $\mu\text{g/ml}$ fue del 42,73% para el ND. Cuando el estudio lo realizaron con aceites esenciales, el descenso del crecimiento de *V. dahliae* fue inferior; el aceite esencial más efectivo fue el de *Thymus* sp., que inhibió el crecimiento un 24,20% en el aislado ND y un 27,50% en el aislado D (Varo *et al.*, 2017). Para el aislado 2397 (ND) se obtuvo una inhibición similar con 31,2 $\mu\text{g/ml}$ del

derivado P4c (28,12%), derivado que menos lo inhibió; en el aislado A112 (D), esto ocurrió a baja concentración del derivado P3 (7,8 µg/ml; 24,36%). Estos datos confirman que aislados distintos de *V. dabaliae*, no muestran las mismas pautas de comportamiento en lo que respecta a su sensibilidad. Es importante destacar que aislados D de *V. dabliae* muestran mayor virulencia en olivo que aislados ND (López y Mercado, 2011).

Con concentraciones de 125 µg/ml del derivado P3 se alcanzó el 100% de inhibición del crecimiento en *A. niger*; inhibición superior a la obtenida por otros autores utilizando extractos acuosos de hojas de *Ocimum sanctum* (75%) (Gupta et al., 2014). Además, entre los hongos estudiados se alcanzó el 100% de inhibición del crecimiento en *B. cinerea* con 250 µg/ml del derivado pirimidínico P3, *P. cladosporioides* con 125 µg/ml del P3 y *V. dabliae* 2397 con 250 µg/ml del P5. También, con un amplio rango de nitrosopirimidinas se ha descrito un 100% de inhibición del crecimiento en hongos patógenos de humanos (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*) (Olivella et al., 2012). Por otro lado, Jordá (2018), con concentraciones de 300 µg/ml de aceites esenciales de *Mentha longifolia* y *Satureja montana*, y con 200 µg/ml de *S. montana*, obtuvo una inhibición del crecimiento del 100% en *V. dabliae*. Otros compuestos mencionados en la bibliografía con actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos son la oosporeina y beauvericina, metabolitos secundarios liberados por *Beauveria* spp. (Oller-López et al., 2005; Ownley et al., 2010). De hecho, extractos de *B. bassiana* produjeron un 100% de inhibición del crecimiento de *V. dabliae* (Lozano-Tovar et al., 2017). En otro ensayo, Zhang et al. (2020), reportaron una inhibición de solo un 60,99% del crecimiento de *V. dabliae*, utilizando la bacteria *Enterobacter* sp. V1.

En estudios realizados con *B. cinerea*, el crecimiento se inhibió un 35% con extractos acuosos de *Trigonella foenum-graecum* (Haouala et al., 2008), inhibición similar a la obtenida con 7,8 µg/ml del derivado P3 (32,93%). Además, Tabor-da et al. (2015), utilizando extractos etanólicos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* y *Thymus vulgaris*, inhibieron *B. cinerea* un 41%; valor que no supera el alcanzado con 31,2 µg/ml del derivado P3 (62,83%; **Tabla 4**). En trabajos recientes, Chaouachi et al. (2021), utilizando bacterias endófitas de tomate, inhibieron *B. cinerea* en un 76,7% y 64,5% (razas S2 y S5, respectivamente), valores inferiores al obtenido con el derivado P3 a la máxima concentración. Por tanto, los derivados pirimidínicos estudiados en el presente trabajo pueden ser una alternativa de interés en la inhibición del crecimiento de *B. cinerea*.

En todos los hongos, el principio activo donde se detectó inhibición del crecimiento a la menor concentración fue en P3. Dicho derivado inhibió el crecimiento de *Alternaria*, *A. niger* y *V. dabliae* 2397 a la concentración más baja

(3,9 µg/ml); en *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *V. dahliae* A112 esto ocurrió a 7,8 µg/ml, mientras que en *P. cladosporioides* fue a 15,6 µg/ml. Además, en el derivado P5 los dos aislados de *V. dahliae* tuvieron un comportamiento similar al P3, al igual que ocurrió en *P. cladosporioides* con el fungicida comercial [Oxicloruro de Cobre (22%) + Mancozeb (17,5%)], en *A. niger* con P4c y P5 y en *Alternaria* con todos los principios activos. Por tanto, la mínima concentración de principio activo a la que hubo descenso del crecimiento varió según el hongo y el principio activo ensayado.

El crecimiento fúngico en presencia de fungicida comercial varió en función del hongo. Solo se obtuvo un 100% de inhibición con el fungicida comercial (22% oxicloruro de cobre + 17,5% Mancozeb) en *B. cinerea* (125 µg/ml) y *P. cladosporioides* (62,5 µg/ml). Casado *et al.* (2017), también consiguieron una inhibición total de *P. cladosporioides* con el uso de oxicloruro de cobre y Mancozeb a concentraciones superiores (30 y 20%, respectivamente). Al igual que con el derivado P3, Fernández (2019) describió una inhibición del crecimiento de *P. cladosporioides* del 100% con otros derivados pirimidínicos.

La concentración mínima de principio activo que inhibió un 50% el crecimiento (MIC_{50}) presentó los valores más bajos para el derivado P3 en *A. niger*, *Alternaria*, *V. dahliae* A112, *B. cinerea*, *P. cladosporioides* y *F. oxysporum* (10,79 µg/ml, 18,06 µg/ml, 29,95 µg/ml, 30,64 µg/ml, 34,32 µg/ml y 56,41 µg/ml, respectivamente); en *P. cladosporioides* esto ocurrió con el fungicida comercial (15,38 µg/ml) y en *V. dahliae* 2397 con el derivado P5 (6,94 µg/ml). A pesar de ello, cabe destacar que con el resto de principios activos, el aislado ND de *V. dahliae* (2397) mostró valores de MIC inferiores que el aislado D (A112), confirmando los resultados presentados en otros apartados del presente trabajo y en consonancia a lo descrito por otros autores (Carrero *et al.* 2016). En el caso de *B. cinerea*, en estudios realizados por Simionato *et al.* (2017) con una fenazina producida por *Pseudomonas aeruginosa* (ácido fenazina-1-carboxílico), el MIC_{50} mostró valores inferiores (3,12 µg/ml) a los obtenidos para el derivado P3.

En consecuencia, los derivados pirimidínicos mostraron un elevado efecto antifúngico frente a los hongos patógenos estudiados. El derivado P3 fue el que mostró mayor actividad antifúngica en *Alternaria*, *A. niger*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *V. dahliae* A112. En el caso de *V. dahliae* 2397 esto ocurrió con el derivado P5 y en *P. cladosporioides* con fungicida comercial, aunque en ambos casos, estos principios activos estuvieron seguidos muy de cerca por el derivado P3.

Efecto sobre *L. sativa*

La fitotoxicidad de los derivados pirimidínicos y el fungicida comercial sobre *L. sativa* fue evaluada mediante el efecto inhibitorio de la germinación y de la elongación de plántulas (Uribe, 2008).

En estudios realizados por otros autores utilizando cumarinas sintéticas, observaron una elevada inhibición de la germinación de *Amaranthus retroflexus* y *Echinochloa crus-galli* a bajas concentraciones (Araniti et al., 2015). En el caso de los derivados P3 y P5, *L. sativa* alcanzó la máxima inhibición con 62,5 y 125 µg/ml, mientras que con el derivado P4c esto ocurrió con 250 µg/ml. La inhibición de la germinación fue superior en P3, mientras que en P4c y P5 tuvo el mismo valor. Por tanto, el derivado que menos afectó la germinación fue P4c. Los valores de EC₅₀ confirman la mayor toxicidad del derivado P3, capaz de inhibir un 50% la germinación con 25,19 µg/ml. Esta concentración fue superior a las descritas por Araniti et al. (2015) para las cumarinas. Otros compuestos fitotóxicos frente a *L. sativa* y otras especies vegetales son los alcaloides, cumarinas y flavonoides aislados de las familias *Rutaceae* y *Meliaceae* (Nebo et al., 2014). Según estos autores, la mayoría de las moléculas mostraron niveles de bioactividad similar a un herbicida comercial.

Con el derivado P3, la máxima concentración que no disminuyó la germinación fue 3,9 µg/ml (21,10 µM); concentración a la que se inhibió el crecimiento de *Alternaria* (34,79%), *A. niger* (25,50%) y *V. dahliae* 2397 (7,38%). En el caso del derivado P5, no hubo inhibición de la germinación hasta una concentración de 15,6 µg/ml (84,71 µM); esta concentración descendió el crecimiento de *Alternaria* (21,89%), *A. niger* (40,49%), *V. dahliae* A112 (22,72%) y *V. dahliae* 2397 (71,01%). Con el derivado P4c y el fungicida comercial, 31,2 µg/ml (115,87 y 146,09 µM, respectivamente) fue la mayor concentración a la que no descendió la germinación. A dicha concentración de P4c descendió el crecimiento de *Alternaria* (29,30%), *A. niger* (35,57%), *B. cinerea* (14,95%), *F. oxysporum* (39,68%), *V. dahliae* A112 (11,95%) y *V. dahliae* 2397 (28,12%). Como podemos observar, a estas concentraciones la inhibición del crecimiento en el aislado 2397 (ND) fue 3,1 y 2,3 veces superior a la del aislado A112 (D) de *V. dahliae* con los derivados P5 y P4c, respectivamente. Con 31,2 µg/ml de cobre + mancozeb (146,09 µg/ml) las respectivas inhibiciones del crecimiento para *Alternaria*, *A. niger*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. cladosporioides*, *V. dahliae* A112 y *V. dahliae* 2397 fueron 54,14%, 23,27%, 33,41%, 30,35%, 72,03%, 21,32% y 12,33%. Para el caso de los derivados P4c y P5, las concentraciones que no afectan a la germinación fueron superiores a las descritas por Araniti et al. (2015); según estos autores, concentraciones de 50 µM

de cumarina inhibieron la germinación significativamente. En consecuencia, la máxima inhibición del crecimiento de *Alternaria*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*, sin que se afecte la germinación de *L. sativa* se obtuvo con una concentración de 31,2 µg/ml de cobre + mancozeb; en *A. niger*, *V. dahliae* A112 y *V. dahliae* 2397 esto ocurrió con 15,6 µg/ml del derivado P5.

La inhibición del crecimiento de *L. sativa* presentó los valores más altos con 62,5 µg/ml de P4c, 125 µg/ml de P3 y cobre + mancozeb y 250 µg/ml de P5. Los derivados P3 y P5 consiguieron inhibir la elongación en su totalidad. Además, es importante destacar que en P4c hubo menos inhibición que en cobre + mancozeb. La elongación de la plántula no se inhibió con 15,6 µg/ml del derivado P3 y cobre + mancozeb, ni con 31,2 µg/ml de P4c y P5; estas concentraciones fueron superiores a las descritas para la germinación en los derivados P3 y P5. Otros autores, utilizando extractos orgánicos de *Piper divaricatum* al 2,5%, han descrito una fuerte inhibición de la elongación de la planta y de la raíz (43% y 93%, respectivamente) (Martins *et al.*, 2021). Araniti *et al.* (2015), en sus estudios con cumarinas sintéticas, encontraron que todas las moléculas afectaban fuertemente el crecimiento de las raíces de *A. retroflexus* y *E. crus-galli*.

Es importante destacar que a la concentración de 15,6 µg/ml del derivado P3 hubo inhibición del crecimiento en todos los hongos estudiados (44,65% para *Alternaria*, 64,21% para *A. niger*, 32,93% para *B. cinerea*, 15,55% para *F. oxysporum*, 6,68% para *P. cladosporioides*, 49,89% para *V. dahliae* A112 y 48,86% para *V. dahliae* 2397). Con 31,2 µg/ml del derivado P5 se inhibió el crecimiento de *Alternaria* (32,40%), *A. niger* (52,80%), *F. oxysporum* (21,70%), *V. dahliae* A112 (33,73%) y *V. dahliae* 2397 (79,87%). Con 31,2 µg/ml del derivado P4c descendió el crecimiento de *Alternaria* (29,30%), *A. niger* (35,57%), *B. cinerea* (14,95%), *F. oxysporum* (39,68%), *V. dahliae* A112 (11,95%) y *V. dahliae* 2397 (28,12%). En el caso del cobre + mancozeb, con 15,6 µg/ml se inhibió el crecimiento de todos los hongos, excepto el de *B. cinerea*. Esta inhibición fue del 38,14% para *Alternaria*, 17,90% para *A. niger*, 13,73% para *F. oxysporum*, 67,08% para *P. cladosporioides*, 16,63% para *V. dahliae* A112 y 12,10% para *V. dahliae* 2397. Por tanto, las concentraciones máximas de principio activo a las que no hubo inhibición de la elongación de *L. sativa*, pero sí del crecimiento fúngico, fueron 15,6 µg/ml del derivado P3 para *Alternaria*, *A. niger* y *V. dahliae* A112, 15,6 µg/ml de cobre + mancozeb para *B. cinerea* y *P. cladosporioides* y 31,2 µg/ml de P5 para *V. dahliae* 2397.

Los derivados P3, P4c y P5 mostraron valores inferiores de EC₅₀ en el crecimiento que, en la germinación, por tanto, la elongación fue un proceso más sensible que la germinación a la presencia de derivado pirimidínico en el medio. Resultados que contrastan con los obtenidos por Araniti *et al.* (2015) usando

cumarinas sintéticas en otras especies vegetales. Dichos autores detectaron valores de EC_{50} para la elongación de la raíz de *Amaranthus retroflexus*, *Echinochloa crus-gall* y *Arabidopsis thaliana*, inferiores a los observados para los derivados P4c y P5 en *L. sativa*. En lo que respecta a los resultados obtenidos para el fungicida comercial, la elongación fue menos sensible que la germinación.

Conclusiones

Según los resultados presentados en este trabajo, en *Alternaria*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *V. dahliae* A112 el principio activo más efectivo en el control del crecimiento fue el derivado P3. En *P. cladosporioides* esto ocurrió con cobre + mancozeb y en *V. dahliae* 2397 con el derivado P5; en ambos casos seguido por el derivado P3. *A. niger* fue el hongo que más se afectó en presencia de los derivados P3 y P4c, sin embargo, fue el menos sensible al fungicida comercial.

Los hongos menos sensibles al derivado P4c fueron *Alternaria*, *B. cinerea* y *P. cladosporioides*; en dichos hongos no se alcanzó el 50% de inhibición del crecimiento con la máxima concentración. Además, estos hongos también fueron los menos sensibles al derivado P5 y los más sensibles al fungicida comercial.

La inhibición del crecimiento varió entre los distintos aislados de *V. dahliae* estudiados; esta inhibición fue superior en el aislado ND que en el aislado D.

En lo que respecta al efecto fitotóxico de los derivados pirimídnicos P3, P4c y P5, la elongación fue más sensible que la germinación. El derivado P3 fue el que mostró más actividad frente a la germinación y crecimiento de *L. sativa*. Aun así, a concentraciones bajas se puede inhibir el crecimiento fúngico sin que se afecten estos procesos.

Bibliografía

- Araniti, F., Mancuso, R., Lupini, A., Giofrè, S.V., Sunseri, F., Gabriele, B. y Abenavoli, M.R. (2015): "Phytotoxic potential and biological activity of three synthetic coumarin derivatives as new natural-like herbicides". *Molecules*, 20, 17883-17902.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J. y Bakker, P.A.H.M. (2012): "The rhizosphere microbiome and plant health". *Trends in Plant Science*, 17, 478-486.
- Casado, M. C., Díaz, R. y Díaz, A. (2017): "Repilo plumizo del olivo: estudio in vitro del efecto de diferentes fungicidas sobre el crecimiento y supervivencia de *Pseudocercospora cladosporioides*". XVIII Simposium Científico-Técnico Expoliva.

- Castillo, G. (2004): "Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones". IDRC, IMTA. Canadá, 202.
- Cordovilla, M. P., Noguero, R., San Eufrasio, B. y Marchal, A. (2017): "Estudio de las propiedades antifúngicas frente a *Verticillium dahliae* de diferentes 5-nitrosopirimidinas". *Phytoma*, 29, 162-163.
- 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. y Foster, G.D. (2012): "The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology". *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Díaz, M. D. C. C., Santiago, J. D. L. R. y Luna, J. L. (2013): "Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con semillas". *Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos*, 3, 87-105.
- Carrero, I., Trapero, J. L., Olivares, C., Monte, E., Hermosa, R. y Jiménez-Díaz, R. M. (2016): "*Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium* wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*". *Crop Protection*, 88, 45-52.
- Chaouachi, M., Marzouk, T., Jallouli, S., Elkahoui, S., Gentzittel, L., Ben, C. y Djé-bali N. (2021): "Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*". *Postharvest Biological and Technology*, 172, 111389. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111389>.
- Dean, R., Van Kan, J.A.I., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. y Foster, G.D. (2012): "The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430.
- Fawcett, C.H. y Spencer, D.M. (1970): "Plant Chemotherapy with natural products". *Annual Review of Phytopathology*, 8, 403-418.
- Fernández, C. (2019): *Estudio de la actividad de derivados pirimidínicos sobre hongos patógenos del olivo*. Trabajo Fin de Master. Universidad de Jaén.
- Gupta, S. P., Rana, K. S., Sharma, K. y Chhabra, B. S. (2014): "Antifungal activity of aqueous leaf extract of *Ocimum sanctum* on dominant fungal species of monuments". *European Chemical Bulletin*, 2(6), 609-611.
- Guo, J., Zhang, L. S., Wang, Y. M., Yan, C. H., Huang, W. P., Wu, J., Yuan, H.T., Lin, B.W, Shen, J.L. y Peng, S. Q. (2011): "Study of embryotoxicity of Fusarium mycotoxin butenolide using a whole rat embryo culture model". *Toxicology in Vitro*, 25 (8), 1727-1732.
- Haouala, R., Hawala, S., El-Ayeb, A., Khanfir, R. y Boughanmi, N. (2008): "Aqueous and organic extracts of *Trigonella foenum-graecum* L. inhibit the mycelia growth of fungi". *Journal of Environmental Sciences*, 20(12), 1453-1457.

- Jordá, S. (2018): *Composición química y actividad antifúngica de los aceites esenciales Satureja montana y Menta longifolia*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Jin, W. y Wu, F. (2015): "Characterization of miRNAs associated with *Botrytis cinerea* infection of tomato leaves". *BMC Plant Biology*, 15, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0410-4>
- Kong, W.L., Li, P.SI, Wu, X.Q., Wu, T.Y. y Sun X.R. (2020): "Forest tree associated bacterial difusible and volatile organic compounds against various phytopathogenic fungi". *Microorganisms*, 8, 590. <https://doi:10.3390/microorganisms8040590>
- Li, X., Li, K., Zhou, D. Zhang, M., Qi, D., Jing, T., Zang, X., Qi, C., Wang, W. y Xie, J. (2021): "Biological control of banana wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* using *Streptomyces* sp. H4". *Biological Control*, 155, 104524. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104524>
- López, A., López, S. R., Vázquez, M. E., Rodríguez, S. A., Mendoza, M. y Padrón, E. (2005): "Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. mediante extractos vegetales acuosos". *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2), 183-190.
- López, F. J. y Mercado, J. (2011): "Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen". *Plant and Soil*, 344(1-2), 1-50.
- Lozano-Tovar, M. D., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E., Raya-Ortega, M. C. y Trapero-Casas, A. (2017): "Metarbizium brunneum and Beauveria bassiana release secondary metabolites with antagonistic activity against Verticillium dahliae and Phytophthora megasperma olive pathogens". *Crop Protection*, 100, 186-195.
- Marchal, A., Noguerras, M., Sánchez, A., Low, J. N., Naesens, L., De Clercq, E. y Melguizo, M. (2010): "Alkoxy-5-nitrosopyrimidines: Useful Building Block for the Generation of Biologically Active Compounds". *European Journal of Organic Chemistry*, 20, 3823-3830.
- Martins, S. A., dos Santos, R. C., Ramos, A. R., Figueiredo, P. L. B., da Silva, C. R. C. y da Silva J.K.R. (2021): "Allelopathic potential and phytochemical screenign of *Piper divaricatum* extracts on germination and growth of indicator plant (*Lactuca sativa*)". *South African Journal of Botany*, 138, 495-499.
- McQuilken, M. P. y Thomson, J. (2008): "Evaluation of anilinopyrimidine and other fungicides for control of grey mould (*Botrytis cinerea*) in container-grown *Calluna vulgaris*". *Pest Management Science*, 64(7), 748-754.
- Miura, I. y Maeno, S. (2007): "Biochemical basis of selective disease controlling activity of mepanipyrim". *Journal of Pesticide Science*, 32, 77-82.
- Nagata, T., Masuda, K., Maeno, S. y Miura, I. (2003): "Synthesis and structure-activity study of fungicidal anilinopyrimidines leading to mepanipyrim (KIF-3535) as an anti-*Botrytis* agent". *Pest Management Science*, 60(4), 399-407.

- Nebo, L., Varela, R. M., Molinillo, J. M. G., Sampaio, O. M., Severino, V. G. P., Casal, C. M., Fernandes, M. F. G., Fernandes, J. B. y Macías F. A. (2014): "Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the *Rutaceae* and *Meliaceae* families". *Phytochem Letters*, 8, 226-232.
- Olivella, M., Marchal, A., Nogueras, M., Sánchez, A., Melguizo, M., Raimondi, M., Zacchino, S., Giannini, F., Cobo, J. y Enriz, R. D. (2012): "Structure-activity relationship study of nitrosopyrimidines acting as antifungal agents". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(20), 6109-6122.
- Olivella, M., Marchal, A., Nogueras, M., Melguizo, M., Lima, B., Tapia, A., Feresin, G. E., Parravicini, O., Giannini, F., Andujar, S. A., Cobo, J. y Enriz, R. D. (2015): "A New Series of Antibacterial Nitrosopyrimidines: Synthesis and Structure-Activity Relationship". *Archiv der Pharmazie*, 348(1), 68-80.
- Oller-López, J. L., Iranzo, M., Mormeneo, S., Oliver, E., Cuerva, J. M. y Oltra, J. E. (2005): "Bassianolone: an antimicrobial precursor of cephalosporolides E and F from the entomoparasitic fungus *Beauveria bassiana*". *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3(7), 1172-1173.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (2006): "Terrestrial Plant Test. Seedling Emergence and Seedling Growth Test". *Guideline for Testing of Chemicals*. N.º 208. París.
- Ostle, B. (1963): *Statistics in research*. Iowa: The Iowa State University Press.
- Ownley, B. H., Gwinn, K. D. y Vega, F. E. (2010): "Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution". *BioControl*, 55(1), 113-128.
- Pan, Z., Li, X., Yang, B. X., Andrade, D., Xue, J. y McKinney, N. (2010): "Prediction of plant diseases through modelling and monitoring airborne pathogen dispersal", en D. Hemming (ed.), *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutrition and Natural Resources*. Reino Unido, CAB Reviews: CABI, 191-202.
- Pieterse, C. M. J., de Jonge, R., Berendsen, R. L. (2016): "The Soil-Borne Supremacy". *Trends in Plant Science*, 21, 171-173.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., Nelson, A. (2019): "The global burden of pathogens and pests on major food crops". *Nature Ecology and Evolution*, 3, 430-439.
- Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., de Jesús, M. L. A., Barazetti, A. R., da Silva, C. S., Simoes, G. C., Balbi-Peña, M. I., de Mello, J. C. P., Panagio, L. A., Almeida, R. S. C., Andrade, G. y de Oliveira, A. G. (2017): "The effect of Phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain". *Frontiers in Microbiology*, 8, 1102. [https://doi: 10.3389/fmicb.2017.01102](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01102)
- Taborda, L. A., Sánchez, M. S., Bonilla, C. R. y Huertas, C. (2015): "Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como

Estudio de la actividad de tres derivados pirimídicos
María del Pilar Cordovilla Palomares et al.

- alternativas de manejo de *Botrytis cinerea* en fresa”. *Acta Agronómica*, 64 (1), 93-99.
- Varo, A., Mulero-Aparicio, A., Adem, M., Roca, L.F., Raya-Ortega, M.C., López-Escudero, F. J. y Trapero, A. (2017): “Screening water extracts and essential oils from Mediterranean plants against *Verticillium dahliae* in olive”. *Crop protection*, 92, 168-175.
- Villa, A., Pérez, R., Morales, H.A., Basurto, M., Soto, J. M. y Martínez, E. (2015): “Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad anti-fúngica de extractos vegetales”. *Acta Agronómica*, 64(2), 194.
- Xie, Z., Li, M., Wang, D., Wang, F., Shen, H., Sun, G., Feng, C., Wang, X., Chen, D. y Sun, X. (2021): “Biocontrol of *Bacillus siamensis* LZ88 against Brown spot disease of tobacco caused by *Alternaria alternata*”. *Biological Control*, 154, 104508. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104508>.
- Yang, Y., Zhang, S., Li, K. (2019): “Antagonistic activity and mechanism of an isolated *Streptomyces corchorusii* strain AUH-1 against phytopathogenic fungi”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 145. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2720-z>.
- Zang, L., Tao, Y., Zhao, S., Yin, X., Chen, J., Wang, M., Cai, Y. y Niu, A. (2020): “A novel peroxideroxin from the antagonistic endophytic bacterium *Entereobact* sp. V1 contributes to cotton resistance against *Verticillium dahliae*”. *Plant and Soil*, 45, 395-409.
- Zhu, Y. Z., Keum, Y. S., Yang, L., Lee, H., Park, H. y Kim, J. H. (2010): “Metabolism of a fungicide mepanipyrim by soil fungus *Cunninghamella elegans* ATCC36112”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12379-12384.