

**Evaluación de la actividad antifúngica de ditiocarbamatos de alquilo derivados de vinilcetonas contra *Fusarium oxysporum* en plantas de uchuva (*Physalis peruviana*) bajo condiciones de invernadero**



**AUTOR**

**Natalia Carolina Agudelo Ibáñez**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

**BIOLOGÍA APLICADA**

Director:

**Ivon Buitrago**

Co-director:

**Diego Enrique Quiroga**

**Universidad Militar Nueva Granada**

**Facultad de Ciencias Básicas y aplicadas**

**Biología Aplicada**

**Bogotá D.C 2020**

**Evaluación de la actividad antifúngica de ditiocarbamatos de alquilo derivados de vinilcetonas contra *Fusarium oxysporum* en plantas de uchuva (*Physalis peruviana*) bajo condiciones de invernadero**



**AUTOR**

**Natalia Carolina Agudelo Ibáñez**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

**BIOLOGÍA APLICADA**

Director:

**Ivon Buitrago**

Co-director:

**Diego Enrique Quiroga**

**Universidad Militar Nueva Granada**

**Facultad de Ciencias Básicas y aplicadas**

**Biología Aplicada**

**Bogota D.C 2020**

## **Agradecimientos**

Agradezco infinitamente a mi hermano Luis Agudelo por soñar a mi lado, por ser cómplice de las metas de mi vida y por haberse comprometido como un padre para que yo pudiera lograr todo esto, sin el simplemente esto no hubiera sido posible.

A mi madre por enseñarme tantas cualidades entre ellas la fortaleza y perseverancia, ya que gracias a esto he podido seguir adelante a pesar de los inconvenientes.

A mi directora por su disposición para trabajar en este proyecto y estar atenta y ofrecer apoyo, a mi co-director Diego Quiroga por permitirme trabajar con él durante estos 5 años, por ser un mentor y un amigo, agradezco por su apoyo durante tanto tiempo y por darme la oportunidad de trabajar e implementar ideas.

A la Universidad Militar Nueva Granada, porque con sus instalaciones y todos los servicios disponibles para nosotros los estudiantes hacen nuestro proceso más cómodo, al grupo de investigación InQuiBio por toda la ayuda ofrecida, al personal de laboratorio, que siempre fue incondicional conmigo, especialmente un agradecimiento a Melba Rodriguez, Camilo Duque, Dolly Ciendua, Eddy Romero, Carolina Rozo, Hernando Bonilla, Fernando Sanabria.

A los docentes en mi proceso de formación, gracias porque cada uno me permitió escoger y enamorarme de muchos aspectos de la vida, especialmente agradezco a los profesores: Roberto Quiñones por mostrarme el mundo de la agroecología desde todos los puntos, Juan Jose Filgueira por toda la confianza, por los consejos académicos y por mostrarme lo amplio de la biología molecular, a la profesora Mariana Restrepo por darle sentido a la microbiología.

Agradezco a mis compañeros y amigos que forme durante mi proceso como profesional, pues estuvieron acompañándome en todo momento, me permitieron crecer como persona, y a todas las personas que fueron amables conmigo, que estuvieron al pendiente.

Muchas gracias

## Tabla de contenido

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>5</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
<b>Uchuva (<i>Physalis peruviana</i> L.)</b> .....	<b>6</b>
Ecofisiología de <i>P. peruviana</i> .....	7
Temperatura.....	7
Suministro de agua al suelo .....	8
Luz .....	8
Altitud .....	9
Importancia ecológica de <i>Physalis peruviana</i> L .....	9
Importancia económica .....	9
Problemáticas del cultivo .....	10
<b><i>Fusarium oxysporum</i></b> .....	<b>11</b>
Generalidades .....	11
Formas especiales .....	13
Interacción planta-patógeno .....	14
<b>Control frente a <i>Fusarium oxysporum</i></b> .....	<b>16</b>
Control químico .....	17
<b>CAPITULO 2</b> .....	<b>20</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
Objetivo general .....	24
Objetivos específicos.....	24
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
FASE LABORATORIO: .....	25
FASE INVERNADERO:.....	31
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>53</b>
<b>OBSERVACIONES</b> .....	<b>54</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>55</b>

## CAPÍTULO 1

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### **Fisiología de *Physalis peruviana* relación e interacción con el fitopatógeno *Fusarium oxysporum*: Una revisión**

El surgimiento de diversos acontecimientos mundiales durante las últimas décadas, ha generado la globalización, las rápidas innovaciones tecnológicas y una intensificación de los flujos comerciales y de capitales que contribuyeron a un crecimiento económico inigualable y a mejorar los niveles de vida en el mundo (Perfetti & Cortés, 2013). Algunas de las implicaciones de la globalización inciden directamente sobre el accionar de la agricultura y la situación de la vida rural, con ello todo el proceso económico, tecnológico, político, social y cultural a escala mundial que ha permitido generar la división entre los procesos de producción en subprocesos (Gil, 2009). De esta manera es posible dejar de ver a la agricultura como una actividad primaria básica a una mucho más amplia en la que se considera como un conjunto de actividades con relación directa a la economía, de tal forma que esta recibe una mayor receptividad social y política a la importancia que tiene la agricultura hacia el futuro y cómo este conjunto de actividades hace parte del punto estratégico del desarrollo de las naciones, de tal forma que, existe una necesidad de que los países en desarrollo estructuren y establezcan estrategias y políticas necesarias para impulsar el desarrollo de la agricultura y de los territorios rurales (Perfetti & Cortés, 2013).

Colombia, al igual que la mayoría de los países de América Latina, ha fundamentado su crecimiento económico en su potencial agrícola (Cardenas & Vallejo, 2016), ofreciendo un 20% más de oportunidad de empleo en el país y aproximadamente 50% en el sector rural. Una fuente de crecimiento de la agricultura colombiana lo constituye el sector frutícola, según Osorio (2016), de 4,0 millones de hectáreas cultivadas en Colombia en el 2012, el 5,8% estuvo representado por cultivos frutales que produjeron 4,0 millones de toneladas, exhibiendo una importancia dinámica de crecimiento en los últimos años (3,8% frente a 1,3% del total agrícola sin café). Lo que para el 2019 fueron 40 millones de hectáreas cultivadas solo el 47,5% estarían siendo realmente utilizadas es decir para un total de 19 millones de hectáreas con un incremento de más del 30% comparado con el 2016 (Alvarez y Zuleta, 2020). Si bien las exportaciones colombianas en materia de frutas han estado lideradas a lo largo de la historia por el banano, en los últimos años la uchuva (*Physalis peruviana* L.) se ha consolidado el segundo producto frutal más exportado del país y para el año 2016 sus exportaciones totales fueron de 5,2 millones de toneladas que significaron 23.600 millones de dólares, garantías económicas que demuestran la importancia y el crecimiento de este cultivo (Fischer et al., 2005). Sin embargo las afectaciones por procesos naturales en este cultivo son variables y pueden estar relacionadas con la interacción de este organismo en el ambiente, su fisiología y su interacción con otros microorganismos. Por esta razón el objetivo de esta revisión es realizar una búsqueda bibliográfica enfocada en los aspectos fisiológicos de *Fusarium oxysporum* y como la interacción de estos, sumado a la interacción de otros factores generan impacto en este cultivo.

#### **Metodología**

Se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando diferentes fuentes como: Scopus, Springer, Agronet, Elsevier; utilizando una ecuación de búsqueda la cual tuvo como propósito la especificidad de la búsqueda. Allí la información fue encontrada y organizada en una tabla por año, categoría del tema y autor, esta información fue recopilada con el fin de tener información hasta la actualidad de los diferentes métodos de interacción y estudios con respecto a *Physalis peruviana* y *Fusarium oxysporum*.

Finalmente se presenta un estudio dinámico de relación y comparación frente a las diferentes interacciones de *Physalis peruviana* y se construye una conclusión que por consiguiente permite la relación a un estudio metodológico como lo es el del capítulo 2.

### **Uchuva (*Physalis peruviana* L.)**

*P. peruviana* L. Es una planta nativa de la región de los Andes. Según Legge en 1974 (Legge, 1974) fueron los Andes peruanos, pero según un estudio realizado por los países pertenecientes a la Convención de Andrés Bello en 1983, un área más grande fue identificada el punto de origen del fruto de *P. peruviana* L. incluyendo los Andes ecuatorianos (Brito, 2002, Puente et al., 2011). Aunque el cultivo de *P. peruviana* L. se extiende por toda América del sur se ha encontrado que Colombia es el país principal donde se cultiva para la exportación siendo el mayor productor seguido de Sudáfrica (Puente et al., 2011).

*Physalis* pertenece a la familia Solanaceae. Es un género que incluye aproximadamente 90 a 100 especies, de las cuales pueden describirse como hierbas anuales o perennes, con una altura desde 20 cm hasta 2 m de altura; se caracteriza por tener *tallos* con ramificación dicotómica, poco o muy ramificados desde la base, cilíndricos, lisos, herbáceos o algunas veces lignificados en la base, en algunas especies llegan a enraizar en los nudos basales. *Hojas* alternas, solitarias o geminadas; pecioladas, la margen entera, sinuada, aserrada o solo con algunos dientes; el *ápice* agudo, obtuso y pocas veces acuminado; la base simétrica u oblicua, rara vez hastada (Ligarreto et al., 2005). Las *Flores* pediceladas, axilares y péndulas, los pedicelos cortos o algunas veces alcanzan hasta 5 cm de largo; *corola* campanulada, con el limbo extendido o angosto, o bien urceolada con el limbo constricto, desde 0,5 mm hasta 6 cm de largo (Figura 1, Cap 1)

*Estambres* cinco. *Anteras* con dehiscencia longitudinal, púrpuras, azules, azules con una línea amarilla o amarillas; *filamento* filiforme, *polen* tricolporado, oblato o prolato. *Ovario* con un estilo filiforme, *estigma* claviforme, algunas veces capitado. *Cáliz en el fruto* acrescente, inflado vesicular, cubre por completo la baya durante la fructificación, el *ápice* agudo, acuminado, subulado o caudado-subulado. *Pedicelos* de 0,6 a 6 cm de largo, pocas veces robustos y recurvos (Ligarreto et al., 2005). Fruto: una baya succulenta o globosa, en su mayoría sésil y pocas veces sobre ginóforo, la baya de color verde, naranja, amarilla o con tonos púrpuras (Benitez & Magallanes, 1998), tamaño de 0,8-2,5 cm de diámetro, semillas numerosas, reniformes, de 1,5-2 mm, amarillas o de color beige (Ligarreto et al., 2005).



**Figura 1.** Planta de uchuva (a), flores y frutos (b), baya (c) y frutos (d) (Gaitan et al., 2018).

### Ecofisiología de *P. peruviana*

Debido a su distribución y sus reportes de origen, se ha distinguido a *Physalis peruviana* L. como una especie típica de los Andes, que crece entre 800 y 3000 m de altitud (Puente et al., 2011; National Research Council, 1989; Fischer y Almanza, 1993; Fisher y Melgarejo, 2014).

### Temperatura

Las temperaturas medias óptimas están entre 13 y 16°C (Fisher et al., 2014), sin embargo, existe un reporte de la temperatura fisiológica basal con una media óptima de 6,3°C, temperatura que utiliza la planta para dar inicio a el crecimiento del tallo con la formación de nudos (Salazar et al., 2006; 2008), también se registraron diferentes temperaturas en relación con los estadios reproductivos (Véase *tabla 1*). De esta manera se puede decir que la uchuva es una planta de climas fríos de las zonas altas tropicales (Fisher y Melgarejo, 2014).

**Tabla 1.** Temperatura óptima para los diferentes estadios reproductivos en la planta de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) reportados por (Salazar et al., 2006; 2008).

Temperatura °C	Estadios reproductivos de la Uchuva
6,3	Inicio del crecimiento de tallo y formación de nudos.
10,8	Aparición de la primera yema
5,6	Transición de la primera yema hasta la floración
10,5	Transición de la primera flor hasta el primer fruto
1,9	Transición del primer fruto hasta su madurez

Cuando las temperaturas son muy altas se ve perjudicado el estadio de floración y fructificación, también, si se llega a temperaturas muy bajas, cerca de 0°C o por debajo podría quemarse la planta (Fischer y Almanza, 2013). Con referencia a las temperaturas del suelo, para suelos calientes (22-29°C), el crecimiento longitudinal de las ramas causa un aumento en los frutos favorece el desarrollo de las hojas mientras que a temperaturas más bajas (6-9°C), existe la posibilidad de un desarrollo pobre de la planta (longitud de ramas, número y tamaño de hojas) (Fischer y Melgarejo, 2014). Pese a ser susceptible a las heladas, después de una helada suelen ocurrir rebrotes de las ramas basales (Flórez et al., 2000)

### **Suministro de agua al suelo**

El agua juega un papel clave en la ecología fisiológica de las plantas, adicionalmente un suministro hídrico adecuado posee a nivel celular un balance normal del agua que genera presión de turgencia, la cual es esencial para la realización de procesos fisiológicos tales como el alargamiento celular, intercambio gaseoso en las hojas, transporte en el floema, transporte a través de las membranas; esta presión de turgencia también contribuye a mantener la rigidez y estabilidad de los tejidos y por lo tanto garantiza un proceso eficiente de la fotosíntesis lo cual da como resultado un crecimiento y desarrollo óptimo de la planta (Vélez y Álvarez, 2012).

La uchuva presenta un crecimiento indeterminado (Fisher, 2000; Mora *et al.*, 2006) tal como otras plantas solanáceas, pasifloráceas y caricáceas por lo tanto, la fase vegetativa y reproductiva tienen un desarrollo simultáneo, que exige un suministro de agua constante durante todo el ciclo (Fischer y Orduz, 2012). Por tal razón, se considera necesario una precipitación distribuida entre los 1000 a 1800 mm durante el año, y, una humedad relativa (HR) entre el 70% - 80%, sin embargo una humedad demasiado alta durante la época de cosecha deteriora el fruto y frena el crecimiento (Fischer y Miranda, 2012).

### **Luz**

La luz representa uno de los factores más heterogéneos, espacial y temporalmente (Reol, 2003); que juega un papel importante en el desarrollo de la planta. Especialmente la luz emitida por el sol, puesto que es una fuente de energía para la fotosíntesis, y que una vez se realiza satisfactoriamente puede determinar la producción y el rendimiento de frutos de la planta (Dussi, 2007) tomado de (Fischer y Melgarejo, 2014).

Verhoeven (1991) reporta que la uchuva también puede crecer en asociación con un bosque abierto, el cual proporciona sombra. Si hay condiciones de una intensidad lumínica reducida (por ejemplo, bajo invernadero) la uchuva crece demasiado exuberante es decir con un mayor crecimiento longitudinal de las ramas en comparación con un cultivo en una zona totalmente abierta (campo abierto), libre de sombra (Fischer, 2000; Fischer et al, 2013). Mora et al., (2006) mencionan que 1.500 a 2.000 horas de luz solar directa al año son óptimas para el tamaño, la calidad y la maduración del fruto de uchuva.

Zapata et al., (2002) mencionan factores importantes que influyen en la calidad de la fruta y por lo tanto son necesarios tenerlos en cuenta para un manejo pre y poscosecha, uno de ellos es la luminosidad, en donde es importante conocer la duración, intensidad y la calidad de la



luz, pues al tener control de este factor es posible tener una mejor clasificación de la fruta que finalmente cumplirá con estándares precisos de calidad y así mismo cumple el destino para mercados de exportación.

### **Altitud**

La altitud está directamente relacionada con los efectos de la temperatura y de la luz, caracterizando así el clima en las zonas altas tropicales como verano en el día y como invierno en la noche (Rundel et al., 1994). Cuando hay un aumento en la altitud, el factor climático más marcado es la disminución de la temperatura (6°C por cada 100 m), también se da el incremento de la radiación ultravioleta, ocasionando en la uchuva un tamaño más bajo, hojas más pequeñas y gruesas (desarrollado para filtrar la radiación UV), condiciones que pueden afectar el pico de producción de la uchuva ocasionando que inicie más tarde (Flórez et al., 2000; Fischer y Melgarejo, 2014). En Colombia la uchuva es cultivada preferiblemente entre sitios con 1800 y 2800 m.s.n.m por lo que es considerada una planta de clima frío (Fischer et al., 2013).

### **Importancia ecológica de *Physalis peruviana* L**

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) tiene una importancia ecológica, medicinal e industrial y posee un alto potencial comercial por lo que se reconoce como un fruto de exportación, apetecido en el mercado nacional e internacional (Cardenal y Maldonado, 2012). Su importancia ecológica está relacionada directamente con su fisiología, al tener un crecimiento robusto y expansivo es utilizada como planta de cobertura para protección de terrenos contra la erosión (Fisher, 2000).

Bado y colaboradores (2005) quisieron mostrar la asociación de fauna insectil en dos especies de *Physalis* (*P. peruviana* y *P. ixocarpa*), allí encontraron un total de 38 especies asociadas a *Physalis peruviana* de las cuales 13 son benéficas. Esto no solo trae a lugar a la planta de uchuva como posible nicho ecológico de diferentes insectos sino a su vez la capacidad de esta planta para generar asociaciones o relaciones interespecíficas entre las diferentes especies que la habitan.

Otra forma de mostrar la importancia ecológica de esta planta es resaltar la interacción biológica con insectos polinizadores, un claro ejemplo de mutualismo. En general, la polinización entomófila de las plantas pertenecientes a la familia de las solanáceas es baja, debido a la poca preferencia que los polinizadores tienen por la mayoría de ellas, sin embargo existen excepciones como lo es para el tomate (*Lycopersicon esculentum*) y la uchuva (*Physalis peruviana* L.). En diferentes estudios (Mosquera, 2002; Talero et al., 2014), fueron generadas prácticas agronómicas en donde se involucraron insectos polinizadores de la familia Apidae, específicamente del género (*Melipona* y *Apis*) siendo estos los agentes polinizadores de la planta de uchuva. Se encontró que, al haber un proceso de polinización, se optimiza la calidad del fruto y las semillas, finalmente rescatan la importancia de la planta y la interacción con diversas especies.

### **Importancia económica**

El cultivo de uchuva actualmente ha extendido su producción a los altiplanos de los países tropicales, subtropicales y a países del caribe, presente en países como Ecuador, Perú, Chile, Colombia y Brasil (Fischer et al., 2014). En Colombia la uchuva presenta una gran demanda con datos que reportan que entre 2012 y 2016 la producción de uchuva aumentó de forma considerable, las toneladas producidas pasaron de 11.305.49 en 2012 a 15.111.78, el área cultivada para el año 2016 paso de 757.83 a 1.23.10, incrementando el área cultivada en un 35%. La producción nacional de uchuva se centró en 3 departamentos: Antioquia con un 13.2% de producción, Cundinamarca con un 29.9% y Boyacá con un 43.2%, que representan un 86% de la producción nacional en el año 2018 (Caballos y Alarcon, 2019). Este aumento de producción anual está relacionado directamente por que se comercializa en mercados nacionales e internacionales (Ammann, 2019). En la actualidad existen aproximadamente 26 compañías que dirigen el proceso de exportación de la uchuva, 6 de ellas lideradas por compañías internacionales de origen europeo, que captan el 47% de las exportaciones del total de compañías, dejando a Colombia como uno de los países con más ventajas competitivas respecto la producción y exportación de la uchuva (Arias et al., 2015). El otro porcentaje de gran importancia en la captura de exportación de uchuva hace parte de industrias nacionales que junto con planes estratégicos buscan generar un tipo de economía amigable con el campesino. La asociación para el progreso campesino (APROCAM) de la vereda San Mateo en el Municipio de Puentes-Nariño, es una organización dedicada a la siembra, producción y comercialización de la uchuva, la cual ha tomado auge durante los últimos años, representando para la asociación rentabilidad y progreso socioeconómico para los integrantes (campesinos del sector) (Cadena y Recalde, 2012). Este tipo de planes estratégicos no solo tienen un enfoque social (Economía familiar) sino que a su vez son una herramienta para penetrar en los nuevos mercados e incursionar en el mercado internacional.

Para Colombia, el cultivo y exportación de uchuva significan una oportunidad de desarrollo económico. Por ello, es cada vez más común encontrar planes estratégicos, o acciones participativas en la producción de uchuva, dado que en los últimos años (entre el 2005 y 2016), las exportaciones de la especie sobrepasaron en un 300% a las demás frutas exóticas como granadilla y gulupa (Mejía y Infante, 2019). Sin embargo, este gran auge exige trabajar sobre la base del mejoramiento de calidad y tecnificación de los sistemas de producción. Las exigencias del mercado internacional para el plan exportador obligan a que el empresario otorgue garantía de la calidad del producto en términos fitosanitarios y de empaque y a su vez asegurar la continuidad de la oferta para que haya constante abastecimiento (Silva, 2006; Torres y Cuellar, 2019).

Entre los problemas más importantes de la comercialización que pueden afectar todo el proceso de desarrollo económico dependiente de exportación de uchuva están los problemas fitosanitarios que afectan la calidad, tamaño y color del fruto.

### **Problemáticas del cultivo**

Una de las principales problemáticas del cultivo de uchuva está relacionada con el cambio de las condiciones ecofisiológicas que estas requieren. La uchuva es uno de los cultivos más afectados por la ola invernal, durante esta temporada las lluvias causan pérdidas de productos y así mismo genera un aumento en el costo de producción (Villarreal et al., 2014). La inundación de un cultivo trae como consecuencia la disminución del oxígeno en el suelo y

bajas temperaturas que llevan a la planta a un bajo y deficiente desarrollo, por otra parte el exceso de humedad ambiental ocasiona un aumento de ataque de plagas y enfermedades (ICA, 2016).

Es importante aclarar que el éxito de esta fruta en las exportaciones está basado en el manejo oportuno de todos los factores productivos y el cumplimiento de las exigencias que los mercados imponen, una de las cuales cobra mayor importancia es la que está enfocada en el manejo integrado de plagas y enfermedades, un aspecto fundamental para obtener un producto de excelente calidad bajo los estándares exigidos por los mercados de exportación (Silva, 2006). Las consecuencias de este aumento de plagas y enfermedades están dirigidas directamente al sector agrícola, el cual es liderado por campesinos agricultores. Un problema fitosanitario puede dañar toda una producción, por lo tanto, acabar con el trabajo de personas que viven del cultivo de uchuva como su fuente principal económica; también, afecta las compras de los principales compradores de uchuva, al no cumplir los estándares de calidad. Las pérdidas se pueden presentar como pérdida total del producto o como la disminución de calidad, cualquiera de ellas se traduce directamente en reducción de precio y posiblemente de empleo (García, 2003).

La escasa información que existe sobre algunos problemas fitosanitarios y la deficiente y escasa aplicación de buenas prácticas de cultivo, ha dado paso al aumento de enfermedades de *Physalis peruviana* (De la Rotta, 2014). Entre las más comunes están las enfermedades provocadas por bacterias como lo es la Mancha grasienta (*Xanthomonas* sp.) y la dormidera o marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), también existen un grupo de microorganismos fungosos asociados a problemas vasculares, foliares, de capacho como lo es el Marchitamiento vascular o fusariosis (*Fusarium oxysporum*), Damping-off o mal de semilleros (*Pythium* sp.), Muerte descendente (*Phoma* sp.) etc. (Smith, 2012; De la Rotta, 2014; ICA, 2016; Acuña et al., 2019). De estas, el marchitamiento vascular es señalado entre los microorganismos de mayor patogenicidad y actualmente es el problema más limitante para el cultivo de uchuva debido a que no existe un producto químico para su control (Smith, 2012).

Las plagas asociadas al cultivo son: Áfidos o pulgones (*Aphis* sp. y *Myzus* sp.), Insectos del orden: Lepidoptera como *Spodoptera* sp., *Agrotis* sp. y *Feltia* sp. causantes daño en raíz de la planta, Díptera como *Liriomyza* sp. causante de daños en las hojas, Coleóptero como *Epitrix cucumeris* (Harris) El adulto se alimenta del follaje, en el cual forma agujeros redondos muy pequeños, Homoptera como *Trialeurodes vaporariorum* causante de la deformación de foliolos y clorosis de diferentes órganos de la planta. También existen plagas asociadas al fruto como lo es el ácaro tostador *Aculops* sp. causante del bronceado en hojas y capachos (Benavides y Mora, 2005).

### ***Fusarium oxysporum***

#### **Generalidades**

*Fusarium oxysporum* es una especie anamórfica circunscrita por un conjunto de criterios morfológicos como lo es la estructura del microconidioforo, la formación y disposición de las diferentes esporas, el color de las colonias y la forma de los macroconidios (Windels y Wiersma, 1992; Fravel et al., 2003). Es un hongo que crece y se reproduce gracias a la

materia orgánica presente en el suelo (Burgess, 1981; Torres, 2000), todas las cepas de *Fusarium oxysporum* son saprofitas (Garret, 1970).

Son hongos que tienen un rápido crecimiento y las colonias son conocidas por producir micelio de color blanco y rosado en el centro. Las características morfológicas principales de *F. oxysporum* son la forma que tienen los macroconidios (esporas fusiformes alargadas), la formación de las clamidosporas (estructuras de resistencia) y la disposición de los microconidoforos (Gordon y Martyn, 1997). Gracias a diferentes estudios detallados sobre las esporas se han podido describir tres tipos diferentes de esporas (macroconidias, microconidias y clamidosporas). Las microconidias se caracterizan por ser unidades celulares de un tamaño entre 5 a 7  $\mu\text{m}$ ; las macroconidias tiene un tamaño promedio de entre 27 a 46  $\mu\text{m}$  y las clamidosporas son esporas que se forman gracias a la unión de hifas y conidios; son las unidades de resistencia de los hongos que le permiten soportar los controles químicos y perdurar en el ambiente cuando no hay plantas para infectar (Torres, 2000).



**Figura 2. Micelio** de color blanco y rosado de *Fusarium oxysporum*



**Figura 3. Tipos de esporas producidas por *Fusarium oxysporum*.** (A) Macroconidios. (B) Microconidios. (C) Clamidosporas (Navarro, 2013).

Este patógeno se caracteriza porque tiene que tener una rápida capacidad de penetrar las raíces de una planta, causando patogenicidad cuando esta penetración permite la invasión en el sistema vascular de la planta (Olivain y Alabouvette, 1997). Las cepas de *F. oxysporum*, que inducen estos síntomas principales como lo es el marchitamiento de los haces vasculares, amarillamiento de las hojas y clorosis del tallo, necrosis y posteriormente la muerte de las plantas (Leslie y Summerell, 2006; Nene et al., 2012; Roy et al., 2020); son responsables de daños severos en muchas especies de plantas económicamente importantes (Torres, 2000), muchas otras cepas pueden penetrar las raíces, pero no invaden el sistema vascular ni causan enfermedades (Fravel et al., 2003).

## Formas especiales

*Fusarium oxysporum* se destaca de varias maneras, una de ellas, posiblemente exclusiva es la que se refiere a la reproducción asexual predominante (Gordon y Martin, 1997). Debido a su reproducción asexual (predominante), *Fusarium oxysporum* se considera un "Complejo de especies" o comúnmente nombrado como la colección de líneas clonales dentro del género *Fusarium* (Guadet et al., 1989; Fravel et al., 2003). *F. oxysporum* incluye poblaciones tanto patógenas como no patógenas, la primera dividida en más de 100 *formas especiales* (Steinberg et al., 2016), cada forma especial de *Fusarium oxysporum* consiste en una o varias líneas clonales que corresponden a grupos de compatibilidad vegetativa, estas formas especiales, han causado grandes pérdidas económicas alrededor del mundo, en una gran variedad de plantas cultivadas (De Granada et al., 2001), por lo tanto *Fusarium oxysporum* patogénico es específico del huésped, de esta manera ataca una o pocas especies de plantas, la especificidad para un huésped particular se designa como forma especial y raza del patógeno (Michielse y Rep, 2009). Sin embargo, la distinción morfológica entre patógenos y no patógenos es mínima, Puhalla (1985) propuso un sistema de clasificación de cepas (*Fusarium oxysporum*) , basado en su compatibilidad vegetativa. Además, varias formas especiales pueden subdividirse en razas basadas en su especificidad patógena a diferentes genotipos, líneas o cultivares de la misma especie huésped (Armstrong y Armstrong 1981).

La agrupación de los aislamientos de *Fusarium* como forma especial basada en la capacidad patológicas sobre cultivares ha sido muy útil para los estudios en fitopatología, es probable que en muchos casos, estos grupos de aislamientos sean genéticamente heterogéneos y posiblemente polifiléticos es decir, de orígenes diferentes (Estupiñan y Ossa, 2007. Esto se puede ver como una deficiencia de los caracteres taxonómicos para alinear especies y agrupaciones sub genéricas de *Fusarium*. El grado de relación genética y taxonómica de los distintos aislamientos de las formas especiales son importantes cuando se pretende aislar e identificar variedades de una especie vegetal, y es por ello que los investigadores han recurrido a herramientas moleculares para proporcionar información necesaria para la construcción de un mapa taxonómico que permite identificar las especies, así como para aclarar y hacer las relaciones evolutivas entre estas mismas (Fravel et al., 2003; Estupiñan y Ossa, 2007).

Actualmente existen diversos estudios donde hacen uso de herramientas moleculares para poder identificar y caracterizar los grupos patogénicos y no patogénicos, y diferenciarlos entre sí, uno de ellos es el estudio de Carmona et al. (2020) donde finalmente proponen una hipótesis que asocia las cepas no patógenas provenientes de cepas patógenas, concluyendo que son cepas provenientes de un grupo monofilético, igualmente Duan et al. (2020) en un análisis con genes secretados del xilema (SIX) demostró que los aislamientos no patógenos eran filogenéticamente diversos, y por lo tanto los aislados de *Fusarium oxysporum f. sp. sesami* (Fos) eran topológicamente monofiléticos. Solo unos pocos pueden denominarse como grupos monofiléticos, es por ello que, se sigue generando un gran esfuerzo de investigación para caracterizar la diversidad de formas especiales de interés particular en la agricultura y así, comprender la interacción planta-patógeno.

## Interacción planta-patógeno

La interacción planta-patógeno es considerado como un proceso complejo especialmente porque las plantas se encuentran en un constante contacto con otros organismos, entre ellos microorganismos potencialmente patogénicos, tales como: bacterias, hongos, virus (Lopez, 2019). Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas y esto es gracias a la manifestación de varios mecanismos de defensa, que incluyen constitutivos e inducibles, cuyo fin es detener, reducir o contrarrestar la infección, las primeras consisten en las barreras físicas preformadas, como lo son las paredes celulares, la epidermis y la corteza, estas barreras no solo protegen a la planta de la invasión sino que a su vez le otorgan a la planta fuerza y turgencia, las segundas conocidas como no constitutivas o inducibles están relacionadas con la señalización o sistema de respuesta de la planta (Ordeñana, 2002; Jones y Dang, 2006)

Los microorganismos patógenos pueden ser virulentos o avirulentos es decir se definen en sí producen o no producen la enfermedad. La virulencia es un grado de patogenicidad (Collinge et al., 2001), que se puede comprender como la habilidad del patógeno para superar la resistencia del hospedador, así, de esta manera es posible diferenciar la una de la otra según los tipos de interacciones entre planta-patógeno (Lopez, 2017). Las interacciones crean relaciones del tipo perjudicial y benéfico, las cuales van desde el efecto negativo al hospedero, es decir cuando existe una interacción compatible que da lugar a la enfermedad y el efecto positivo mutuo entre el hospedero y el microorganismo, la cual se puede ver como un tipo de interacción incompatible y tiene como resultado el no generar ninguna enfermedad (Ramirez, 2014).

En la naturaleza se pueden presentar diversas respuestas al patógeno, estas pueden ir desde una respuesta de inmunidad (ausencia de síntomas de la enfermedad), hasta plantas altamente resistentes (aquellas que presentan algunos síntomas de la enfermedad) o plantas altamente susceptibles (presentan de manera significativa la enfermedad). Este tipo de interacciones son consecuencia de una estrecha coevolución, muchos microorganismos se desarrollan de una forma patogénica solo en un ámbito limitado de hospedantes, usualmente a nivel de género, especie y subespecies. Del mismo modo, las especies y cultivares de planta, por lo general son susceptibles solamente a pocas especies o razas de patógenos (Ordeñana, 2002; Heath, 2000), esto, genera una especificidad dentro de las interacciones.

La especificidad en las interacciones planta-patógeno depende del genotipo de la planta y del patógeno, según Ordeñana (2002), es más fácil estudiar la especificidad a nivel de cultivar, es decir, con especies cultivadas que han sido sometidas a un proceso de mejoramiento genético para producir poblaciones de plantas altamente homogéneas en su contenido genético. Como consecuencia de este proceso, aparecen nuevas razas de patógenos, específicas para cada cultivar, esto ocurre porque existe una presión de selección. Sin embargo, de no existir un mejoramiento genético y por lo tanto, la no obtención de plantas homogéneas, es correcto hablar de una interacción raza-cultivar (Resistencia determinada por la raza), en donde una especie de hospedante puede presentar cultivares que muestran resistencia y otros que muestran susceptibilidad a un patógeno dado, el cual a su vez puede presentar razas tanto virulentas como avirulentas para un cultivar determinado (Collinge et al. 1994) Este tipo de interacción se puede ver más a menudo para los cultivos de pequeños

agricultores del país, que buscan una solución eficaz y económica que no ponga en riesgo la economía y su producción.

Para comprender esta interacción planta-patógeno es de gran importancia comprender a *Fusarium oxysporum* y su proceso de infección. *F. oxysporum* es un patógeno de la raíz hemibiotrófica, lo que significa que actúa como un biotrófico, en las primeras etapas de su ciclo de vida, se alimenta de células vivas del huésped y establece la infección antes de pasar a una fase necrótica para completar su ciclo de vida (Brown y Ogle, 1997). El proceso de infección se divide en la adherencia, la penetración y la colonización. Las hifas infecciosas se adhieren a la superficie de la raíz y la penetra directamente (Mendeng et al., 1996). De esta manera el micelio entonces progresa a través de la corteza intracelular hasta que alcanza y entra en los vasos del xilema. A través de estos vasos conductores el hongo coloniza el huésped, y puede generar microconidios, que pueden ser transportados hacia arriba a través del flujo de savia. Estos microconidios pueden germinar y colonizar el xilema en las partes superiores de la planta. En las etapas severas de la colonización, el hongo ataca al parénquima y se esporula en las superficies del huésped (Pietro et al., 2003). *Fusarium oxysporum* infecta sus plantas hospederas a través de las raíces (Pietro et al., 2003) y durante la penetración y colonización de la raíz secreta enzimas degradadoras como poligalacturonasas, pectatoliasas, xilanasas, cutinasas y las lipasas, que ayudan a obtener fuentes de carbono, estas se adhieren a la superficie de la raíz y penetran los tejidos del huésped (*Physalis peruviana*) (Bravo-Ruiz et al., 2013). Como resultado de un grave estrés hídrico, debido principalmente a la obstrucción de los vasos del xilema por acumulación de micelios fúngicos, producción de micotoxinas y la respuesta de defensa del huésped, los síntomas típicos de la marchitez vascular aparecen en la planta (Pietro et al., 2003). Los síntomas causados por el *Fusarium oxysporum* en las plantas incluyen retraso en el crecimiento, marchitamiento (pérdida de turgencia, amarillamiento y abscisión foliar) y finalmente la muerte de la planta. En cortes transversales del tallo cerca de la base de la planta infectada, un anillo marrón es generalmente visto en la zona del haz vascular (Nogués et al., 2002; Moreno, 2017).



**Figura 4.** Proceso de infección por parte de *Fusarium oxysporum* en los diferentes cultivos (Dita et al., 2018).

En el intento de comprender el proceso de infección, es posible resaltar que uno de los retos de la fitopatología es aquel que detalla cómo el patógeno es reconocido por el hospedero y cómo a partir de su reconocimiento, se establecen interacciones de resistencia y susceptibilidad. Es así como la biología molecular y la bioinformática juegan un papel importante, pues tienen la capacidad de estudiar todo lo relacionado con la expresión génica en eventos de patogenicidad ( Verhage et al., 2010; Lodha y Basak, 2012; Schenk et al., 2012; Soto y Carrascal, 2012). Sin embargo, cuando se trata de proteger la producción de uchuva (*Physalis peruviana*) lo ideal es ofrecer un control que resulte en una alternativa para la marchitez vascular en cultivos como el de *Physalis peruviana*.

### **Control frente a *Fusarium oxysporum***

Cuando se habla de control se habla de una especie de regulación sobre un sistema (RAE, 2020), en este caso hablar sobre el control de un hongo fitopatógeno como *Fusarium oxysporum* es hablar de las alternativas que existen para regular o manejar la enfermedad que este causa. Existen diferentes métodos para controlar un patógeno, sus diferencias principales están determinadas por las medidas o herramientas utilizadas para erradicar o disminuir la enfermedad y con ello el patógeno, entre las más usadas están el control químico, control físico y el control biológico (Acurio, 2012).

Las diferencias de estos controles están principalmente categorizadas por las ventajas o desventajas de cada uno, por lo tanto juega un papel importante aquel que documente menos efectos negativos o menos desventajas. Una de las características que más se busca en un controlador es que este tenga la capacidad de no dejar residuos de químicos sintéticos, también los costos en el desarrollo del producto, la eficacia y velocidad de acción y sobre todas las cosas que este sea amigable con la salud humana y el efecto del medio ambiente, siendo esta última la que ha tenido un mayor impacto a lo largo de los últimos años. El poco efecto nocivo colateral es la ventaja principal que se ha buscado para el control de plagas, y desde un punto de vista ecológico, el control biológico ha tenido mayor éxito (Tejada, 1982; Summy y French, 1988; Guédez et al, 2008). El control biológico consiste en utilizar organismos vivos con el propósito de controlar las poblaciones de otro organismo que causa daños en un cultivo, dentro de las diferentes formas de controlar una plaga esta la que consiste en el uso de plantas, depredadores, parásitos, hongos y bacterias como principales controladores.

Las plantas juegan un papel importante a la hora de intervenir en un cultivo, primero, con muchas de estas se pueden producir aceites esenciales que pueden ser considerados como plaguicidas, también muchas secretan sustancias o fitohormonas que sirven para establecer relaciones simbióticas o antagónicas entre las plantas del cultivo, y finalmente existen cultivos especiales que son considerados como competidores o cultivos trampa que se encargan de alejar o atraer insectos (Ramirez, 1999; Grundy y Short, 2003) . Una clara demostración de cómo utilizar las plantas como controladores está en el estudio de Isidró et al., 2003. En este estudio determinan la secreción de diferentes plantas, es decir evalúan los metabolitos secundarios que lixivian las plantas por diferentes vías y determinan qué efecto positivo o negativo tienen frente a hongos fitopatógenos, en este caso frente *Rhizoctonia solani* Küm y *Fusarium oxysporum*, aquí encuentran que ciertos grupos de plantas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del diámetro de las colonias, también encontraron que algunos grupos



de estas plantas pueden estimular la reproducción al hongo y por lo tanto su efecto antagónico es totalmente nulo.

En otros estudios se encuentra el uso de aceites esenciales para el control de diferentes patógenos, este tipo de control ha sido ampliamente estudiado, con un total de 17.000 resultados en español y 152.000 resultados en inglés en búsqueda de base de datos (Scopus, Google Scholar principalmente). Autores como Daouk et al., 1995; Covarrubias et al., 2013; Ramos, 2019. entre otros. describen los extractos de plantas, ya sean raíces, hojas, frutos; como compuestos aislados beneficiosos, pues consideran que al ser de origen natural juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de un cultivo en contra de microorganismos fitopatógenos. Muchos de estos estudios muestran el efecto inhibitorio respecto al diámetro de la colonia en la caja de petri frente a muchos hongos fitopatógenos, entre esos *Fusarium oxysporum* (García et al., 2006). Los extractos vegetales y aceites esenciales de cada planta pueden tener hasta más de sesenta componentes y de ellos puede existir algunos con propiedades antifúngicas (Villa-Martinez et al., 2015). Generalmente están presentes como mezclas de compuestos y los patógenos pueden ser afectados de manera diferencial por compuestos individuales (Montes, 2009; Villa-Martinez et al., 2015) sin embargo aunque esta solución natural se ve alcanzable también podría llegar a generar un efecto o un impacto negativo en la edafofauna (Iannacone, 2020).

La edafofauna corresponde a la biota específica del suelo y está constituida por poblaciones de microorganismos y macroorganismos que cumplen su ciclo vital o parte de él en el suelo, estando relacionados directa o indirectamente al ciclado de nutrientes (Cruz y Benamú, 2015). Muchos de los organismos que se pueden encontrar en el suelo son beneficiosos y muchas veces pueden trabajar en beneficio de proteger a un grupo de plantas de diferentes patógenos, a este tipo de organismos se les puede conocer como depredadores o control natural. En un estudio en el año 2015 se analizaron por diferentes métodos la abundancia de fauna edáfica, según órdenes y los diferentes usos del suelo, siendo el campo natural y el cultivo uno de los tipos de suelo nombrados, en total hubo una abundancia de 1664 individuos entre ellos varios de la clase Arachnida, Insecta, Gastropoda, Entognatha, y otros organismos como nematodos. Dentro del grupo Insecta y Arachnida y algunos nematodos es posible encontrar depredadores (Controladores) de insectos, u otros invertebrados que son plagas, como lo es el caso de los insectos de la familia Chrysopidae, que en su estado larval son unos depredadores activos y se alimentan de plagas como pulgones y otros pequeños insectos (Iannacone, J. 2020). A este tipo de acciones en las que un organismo depreda a otro causante de daños en el cultivo se le conoce como control biológico por depredación y es una alternativa a los cultivos que se les detecta insectos plaga como: áfidos, ácaros, cochinillas (Badii y Abreu, 2006). En general los depredadores son especies que consumen directamente un gran número de presas en el curso de su vida, sin embargo a pesar de ser una solución a una problemática estos también pueden generar una desventaja, pues no son organismos especializados y al ser depredadores, estos consumen no solo insectos que afectan al cultivo sino también otros que pueden aportar algún beneficio a este mismo, es por ello que en medio de la búsqueda de soluciones apareció el control químico.

## Control químico

El control químico es uno de los más frecuentes para manejar o erradicar por completo a una plaga. Existen diferentes métodos para controlar los diversos problemas de un cultivo, ya sea que se trate de: hongos, maleza, insectos, ácaros y nematodos. Sin embargo, al tratarse de un hongo fitopatógeno como *Fusarium oxysporum*, es usual hablar de fungicidas. El uso de fungicidas químicos es uno de los principales métodos usados para el control de enfermedades en cultivos (Sandoval et al., 2011), se caracterizan porque son de amplio espectro, y estos son clasificados según su composición.

Pese a que las investigaciones genéticas sobre *Fusarium oxysporum* han mostrado resultados promisorios hacia el control de fitopatógenos, un análisis comparativo reciente de los genomas proporcionó información sobre la organización del genoma y la región genómica que gobierna la patogenicidad, revelando que el repertorio de efectores de cada forma especializada probablemente determina la especificidad del huésped. Estos estudios proporcionan una buena diversidad y evolución de la patogenicidad de *F. oxysporum* (Edel-Hermann y Lecomte, 2019), pero aún no están disponibles para fines agrícolas. Por estas razones, el control químico de plagas mediante el uso de productos químicos (agroquímicos) como plaguicidas sigue siendo la alternativa más rentable y eficaz para los cultivos en grandes áreas.

Los fungicidas pertenecientes al grupo del benzimidazol, como el benomil, carbendazim y tiabendazol, han controlado eficazmente a *Fusarium oxysporum* en condiciones *in vitro* y en condiciones de invernadero. Otros agroquímicos como el ciproconazol, propiconazol y procloraz mostraron una reducción del marchitamiento causado por *Fusarium* en alrededor del 80% en plantas de banano (Ploetz, 2015). El suelo fumigado con bromuro de metilo redujo eficazmente la enfermedad de Panamá en Sudáfrica durante unos meses. Sin embargo, el hongo pudo repoblar estos suelos e infectar plantas de banano susceptibles. Los compuestos de fosfonato son potentes contra este fitopatógeno ya que reducen el crecimiento de hongos en condiciones *in vitro*. Las inyecciones de carbendazim en el tejido de los cultivares de Rastali en la India proporcionaron tolerancia a corto plazo, pero los resultados fueron erráticos con los mismos tratamientos en otras partes del mundo. Los procesos de desinfección de maquinaria e implementos agrícolas contaminados con hipoclorito de sodio y detergentes son efectivos contra conidios y clamidosporas de *F. oxysporum* f. sp. Sin embargo, no se aplican a las grandes plantaciones, y se sabe que causan algunos riesgos ambientales e incluso perjudican a los agricultores (Ngowi ET AL., 2007). En algunos países, el procloraz y la azoxistrobina reemplazaron al benomilo para realizar dicho control, incluido el marchitamiento del clavel por *Fusarium* y cultivos de bulbos. Sin embargo, el procloraz nunca se ha registrado para plantas ornamentales en los EE. UU., además que el precio de la azoxistrobina ha limitado su uso en muchos cultivos de bulbos. Un ensayo en *lisianthus* encontró que los materiales que contienen fludioxonil fueron más efectivos contra el marchitamiento por *Fusarium* que los tratamientos con estrobilurina o bioantagonistas: los síntomas se desarrollaron en todos los controles inoculados, pero solo en el 36-42% de las plantas tratadas con fludioxonil. Un segundo ensayo que comparó fungicidas mostró la mejor reducción en la incidencia de enfermedades de las aplicaciones de triflumizol y fludioxonil, que superaron a los tratamientos con benzimidazol, estrobilurina y miclobutanil (Ploetz, 2015). A pesar de esto, se deben considerar varias medidas al usar agroquímicos ya que los efectos secundarios pueden ser incluso más dañinos que el patógeno. Estos efectos sólo aparecen cuando la cantidad de pesticida en el organismo es más importante de lo que puede eliminar, por lo que se acumula y alcanza el nivel tóxico. Por ello, se han buscado varias alternativas

que permitan realizar el control químico de plagas con un impacto mínimo. En concreto, para reducir la presencia de hongos en la etapa poscosecha, se han realizado estudios que contemplan el uso de extractos de plantas resistentes o de compuestos químicos análogos de productos naturales. Esta alternativa es impresionante considerando que los metabolitos secundarios con actividad biológica son del tipo terpenoide, compuestos fenólicos, fenilpropanoides, estilbenos, alcaloides, saponinas y heterociclos, cuya ventaja corresponde a su rápida degradación en el suelo. Por lo tanto, la síntesis de nuevos agentes agroquímicos sigue siendo rentable y aún debe explorarse mediante el empleo de herramientas de síntesis química para mejorar el diseño de nuevos compuestos agroquímicos.

A nivel local, Colombia es uno de los países a nivel mundial que ha seguido continuamente el mercado de agroquímicos, especialmente en frutos con alta importancia en el mercado o de exportación, tales como la uchuva, el banano y frutas de la pasión (Guerrero y Velandia, 2013). Según el ICA (2020), actualmente, los fungicidas por compuestos de tipo imidazol como el carbendazim, son uno de los más utilizados en los diferentes cultivos del país, como también los compuestos de pirimidinas, azufre, mercurio, cobre. El uso de estos fungicidas ha venido en aumento, pero la aplicación desmedida, la falta de regulación en su modo de empleo, ha tenido efectos perjudiciales en el ambiente y la salud humana (Ruiz et al., 2011). Es por ello que en esta investigación se busca crear una alternativa por medio de síntesis que permita crear una solución a una problemática agroecológica y ambiental.

Los ditiocarbamatos de alquilo son compuestos orgánicos de gran utilidad en el sector agrícola dada su actividad biológica frente a diferentes plagas que afectan la producción de diversos alimentos (Gheibi et al., 2005). Los derivados de brassinina (Figura 3) han recibido atención por su promisoría actividad, siendo catalogados como promisorios agentes antifúngicos ecoamigables (Sellam et al., 2006). Teniendo en consideración dichos antecedentes, el grupo InQuiBio de la UMNG, inició la investigación en síntesis de moléculas bioactivas, orientadas a combatir el hongo *Fusarium oxysporum*, un patógeno de amplio espectro. Las investigaciones realizadas en este grupo de investigación permitieron la obtención de resultados promisorios respecto a la formación de ditiocarbamatos de alquilo derivados de L-triptófano (Figura 1) y al mismo tiempo, análogos de brassinina (Figura 3), los cuales mostraron actividad antifúngica promisoría (Quiroga et al. 2016). La practicidad de la síntesis de estas moléculas, que involucra la reacción entre ésteres de alquilo, disulfuro de carbono y aceptores de Michael en condiciones suaves de reacción, permitió extender el conocimiento y la búsqueda de moléculas más complejas, buscando lograr un efecto sinérgico en el cual no sólo se evidenciara un efecto del esqueleto base del aminoácido predecesor, sino el aporte que podría dar una estructura de aceptor de Michael con importancia en el metabolismo de las plantas como las vinilcetonas, específicamente del tipo (*E*)-chalcona (Figura 4).

## CAPITULO 2

### **Evaluación de la actividad antifúngica de ditiocarbamatos de alquilo derivados de vinilcetonas contra *Fusarium oxysporum* en plantas de uchuva (*Physalis peruviana*) bajo condiciones de invernadero**

#### **RESUMEN - ABSTRAC**

The cape gooseberry (*Physalis peruviana*) is a fruit species that has become very important in Colombia because of its potential for export as fresh fruit. The foreign exchange generated represents several million dollars a year, placing it in second place after bananas. In addition, it is also considered an exotic tropical fruit which generates interest in the market, this economic importance has allowed a greater focus on the crop, however one of the most notorious problems is related to diseases transmitted by phytopathogenic fungi, especially *Fusarium oxysporum*, which not only affects many investigations but also the economy and production of the country. *F. oxysporum* is a difficult pathogen to control, because it has the ability to spread through fragments of diseased plants, infected plant material and movement of soil infested with chlamydospores, which can survive for more than 10 years, such characteristics have allowed that the controls of this fungus are minimal and at the same time dangerous to human health, For this reason, this study seeks to incorporate the use of biologically active molecules such as chalcones, amino acids such as tryptophan, putting into practice the use of chemical synthesis to enhance the antifungal activity of such molecules against *Fusarium oxysporum* and at the same time reduce the incidence of this phytopathogen and be environmentally friendly.

#### **PALABRAS CLAVE**

Fitopatógeno, Moleculas bioactivas, Chalconas, Ditiocarbamatos, Fungicidas  
Phytopathogen, Bioactive molecules, Chalcones, Dithiocarbamates, Fungicides, Fungicides

#### **INTRODUCCIÓN**

La uchuva, (*Physalis peruviana*), es una especie frutícola que ha adquirido gran importancia en Colombia por su potencial para la exportación como fruta fresca. Las divisas generadas representan varios millones de dólares al año, posicionándose en el segundo lugar después del banano (Zapata et al., 2002, Amézquita et al., 2010). Además, también es considerada una fruta tropical exótica lo cual genera interés en el mercado (Flores et al., 2000). Pertenecce a la familia Solanaceae y género *Physalis*, que cuenta con más de ochenta variedades que se encuentran en estado silvestre. Estas variedades se caracterizan porque sus frutos están encapsulados dentro de un cáliz o capacho, siendo *P. peruviana*, *P. peruviana* L., la más utilizada por su fruto dulce. De la misma manera, los frutos de las especies *P. angulata* y *P. minima*, *P. ixocarpa* y la *P. pruinosa* que crecen en el Sureste de Asia como malezas, que son comestibles (Verheij y Coronel, 1991, Flores et al., 2000).

La agricultura en el cultivo de Uchuva juega un papel muy importante en el desarrollo económico del país, siendo una fuente de ingresos del área rural. Actualmente Colombia

ocupa el primer puesto como productor mundial (Jurado y Villanueva, 2018). Según Ligarreto (2005), la producción en Colombia es apetecida en los mercados internacionales debido a sus adecuadas características organolépticas (color, sabor y aroma), obtenidas de las condiciones agroclimáticas predominantes de los pisos térmicos templados y fríos de los Andes colombianos, factor que ha permitido la expansión del cultivo a las diversas zonas que presenta este tipo de condiciones (Ligarreto et al., 2015). Las principales zonas productoras del país, se localizan en los Departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Antioquia con más de 600 ha que corresponden a explotaciones de economía campesina, con mano de obra familiar (Amézquita et al., 2010). Adicionalmente, la producción de uchuva genera un alto impacto social ya que es sistema productivo de pequeños productores (Collazos et al., 2019).

Debido a la importancia económica que tiene este fruto, las exigencias de calidad que impone el mercado externo están asociadas a la apariencia del fruto como lo es el color, tamaño, buen sabor y por supuesto, la ausencia de plagas y enfermedades (Zapata, 2006). Sin embargo, el cultivo de uchuva es uno de los más afectados por los cambios asociados al clima, principalmente por los que ocurren durante las temporadas de invierno. Las lluvias causan pérdidas de producto y un incremento en los costos de producción. También, el exceso de humedad puede provocar la disminución de oxígeno en el suelo, junto con las bajas temperaturas, lo que puede llevar a un bajo desarrollo de la planta y un aumento en el ataque de plagas y enfermedades (ICA, 2016). Se ha encontrado que la causa más frecuente de la pérdida en los cultivos son las enfermedades transmitidas por hongos fitopatógenos, constituyéndose como una limitante en la producción y calidad de esta fruta (Zapata et al., 2002).

Góngora y Rojas (2006) y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 2016) reportaron que las enfermedades que más afectan a el cultivo de la uchuva son: Eclerotiniosis causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, Chamusquin o “damping-off” causada por *Pythium* sp., moho gris causada por *Botrytis cinérea*, Marchitamiento vascular o fusariosis causada por *Fusarium oxysporum*, siendo esta última la mayor causante de pérdidas en los últimos años. *Fusarium oxysporum* es un hongo cosmopolita, conocido por ser causante de la enfermedad marchitamiento vascular, que se caracteriza por la aparición de síntomas como el marchitamiento, amarillamiento parcial de las hojas, pérdida de turgencia y coloración marrón de los tejidos del xilema (De Granada et al., 2001).

A pesar de que *F. oxysporum* es un patógeno ampliamente estudiado ya que “actualmente cuenta con más de 290.000 estudios”; es considerado un patógeno de difícil control, pues este tiene la capacidad de diseminarse por medio de fragmentos de plantas enfermas, material vegetal infectado y movimiento de suelo infestado con clamidosporas, las cuales pueden sobrevivir hasta por más de 10 años (Kraft y Pflieger, 2001, Estupiñan y Ossa, 2007). Estas características del patógeno permiten a los investigadores realizar estudios relacionados al manejo de este mismo, una de las técnicas más comunes para el control del patógeno está relacionada con la aplicación de fungicidas comerciales.

Un estudio de la Universidad Federal de Santa Maria (UFMS) en Brasil evaluó el comportamiento del hongo *Fusarium* sp. en diferentes concentraciones de fungicidas, estos fungicidas fueron: Epxiconazol, Piraclostrobina, Ciproconazol, Picoxistrobina, Fluxaproxade y Piraclostrobina. En el estudio se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio y su efectividad en el hongo, la cual fue buena y proporcional a las concentraciones es decir a mayor concentración del fungicida mayor inhibición del hongo (Neto et al., 2020).

Estos mismos, que a su vez son considerados ingredientes activos de diferentes marcas de fungicidas comerciales como lo es *Acronis*, *Vivid-Ec*, traen consigo consecuencias de alto riesgo para la salud al tener constante exposición con el ser humano, pues son mediana y altamente tóxicos y considerados ligeramente peligrosos. Por ello, la necesidad de llevar de manera adecuada el uso de estos productos, sin embargo, este tipo de productos pueden deteriorar la calidad de vida de una persona y con ello llevar a su posible muerte. Lo anterior evidencia la necesidad de crear e implementar estrategias de control alternas como el uso de moléculas bioactivas asociadas a procesos naturales, tal como las fitoalexinas, lo que resulta una alternativa viable para ser implementada en el control químico de este fitopatógeno.

Las fitoalexinas son metabolitos secundarios de naturaleza química diversa, de bajo peso molecular que son sintetizados por las plantas en respuesta a una infección microbiana u a otros factores como un mecanismo de defensa. Esta síntesis se puede activar por la acción de factores inductores o elicitores, tanto exógenos producidos por patógenos, agentes químicos, daños mecánicos; como endógenos producidos por las plantas en respuesta a situaciones de estrés (Mateos y Leal, 2003). Los primeros reportes sobre la presencia de estos metabolitos fueron descritos por Muller y Borger (1940), en este estudio se mostraron evidencias de la resistencia de las plantas a enfermedades producidas por patógenos, en este caso la resistencia de la papa al hongo *Phytophthora infestans*. De estas observaciones surgió la teoría de la presencia de fitoalexinas, como metabolitos secundarios de bajo peso molecular definidas por Muller; como compuestos producidos después de una infección bajo la influencia de dos sistemas metabólicos: la interacción de un organismo hospedero (planta) y un huésped (patógeno) y la inhibición del patógeno (Muller y Borger, 1940; Mateos y Leal, 2003). Más de 300 fitoalexinas han sido identificadas (Torres, 2010), siendo la mayoría compuestos fenólicos, e incluyen otras familias de compuestos químicos diversos como alcaloides, cumarinas, terpenos y otros (Torres, 2010; Mateos y Leal, 2003; Reichling, 1999; Eldon y Hillocks, 1996). Estos compuestos han sido aislados de muchas familias de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, tales como algunas especies de frijol, chícharo, zanahoria, papa y orquídeas, lo cual constituye un punto de partida para el estudio de su biosíntesis, degradación, así como el entendimiento de su papel en la resistencia a enfermedades, regulación genética, para su síntesis y transferencia de genes de una planta a otra (Cavallini, 1998). Un grupo de fitoalexinas de las crucíferas (Cruciferae) o (Brassicaceae) fueron estudiados por Browne, Conn, Ayert y Tewari (1991) y luego caracterizado por Pedras y Abbas Abdoli (2013). Las verduras de la familia de las *Brassicaceae* se consideran alimentos básicos en muchos lugares del mundo, al ser reconocidas como una rica fuente de nutrientes, como las vitaminas (carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico, ácido fólico), minerales (Cu, Zn, P, Mg, entre otros), carbohidratos (sacarosa y glucosa), aminoácidos (por ejemplo, L-alanina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, L-glutamina, L-histidina, L-metionina, L-fenilalanina, L-treonina, L-triptófano y L-valina) y diferentes grupos de fitoquímicos, como las fitoalexinas indólicas (brassinina, espirobrassinina, brassilexina, entre otros) (Jahangir et al., 2009; Silva, 2014).

Pedras y Minic (2014), encontraron que el anillo indólico presente en el L-triptófano, también estaba presente en la estructura de las fitoalexinas de este grupo de plantas, es decir la brassinina, siendo así esta una molécula derivada del L-triptófano, un aminoácido esencial heteroaromático caracterizado por poseer una cadena lateral con el heterociclo indol. Los compuestos de esta clase han sido ampliamente estudiados debido a su importante aplicación en sectores agroindustriales, siendo usados principalmente para el control de

actividades bacterianas y la inhibición de crecimiento de hongos fitopatógenos debido a su actividad antifúngica. Sin embargo, estas moléculas han demostrado tener aplicaciones para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, la neuropatía periferal y alteraciones neurodegenerativas (Montes, 2009; Abonia et al, 2001; Hür, 2002; Hormaza, 2004). Así mismo, los anillos indólicos *N*-sustituidos son clasificados como inhibidores de enzimas o agentes antiinflamatorios, analgésicos, antirreumáticos, antihipertensivos, anticonvulsivos, cardiovasculares y antibacteriales (Bratulescu, 2009; Montes, 2009). El heterociclo indol, es la estructura base para un gran número de alcaloides y compuestos químicos de gran interés. Muchos indoles son comercialmente disponibles y a su vez se obtienen por metodologías sintéticas optimizadas, la aplicación de los compuestos indólicos ha sido reconocida por sus descripciones y antecedentes referidos (Collado, 2014).

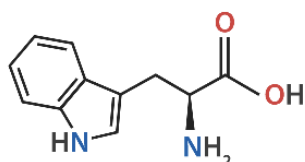


Figura 5. Estructura del *L*-triptófano aminoácido esencial

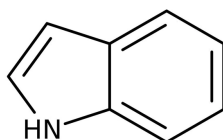


Figura 6. Estructura del 1*H*-indol

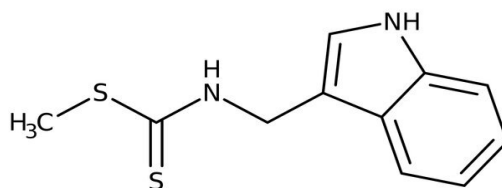


Figura 7. Estructura de la brassinina

El *L*-triptófano es un derivado del 1*H*-indol y al ser un aminoácido esencial constituyente de la mayoría de proteínas, está relacionado con diferentes procesos, tanto en los humanos como aminoácido en el metabolismo, como en plantas como precursor para biosíntesis de AIA (Ácido indol-3-acético y fitoalexinas del tipo brassininas (Burraco, 2005; Vega et al, 2016). Desde el punto de vista de la síntesis orgánica y del entendimiento de la relación que existe entre la estructura de un compuesto orgánico y su actividad biológica, resulta interesante y práctico llevar a cabo algunas variaciones en grupos funcionales de los núcleos básicos de algunas de las moléculas de interés. Particularmente, teniendo en cuenta el amplio campo de acción que pueden tener los derivados de 1*H*-indol, este proyecto de tesis tiene como objetivo hacer variaciones estructurales usando métodos sintéticos a partir del uso de dicho

aminoácido. Buscando un efecto sinérgico orientado a potenciar la actividad biológica de los nuevos derivados sintéticos, se estableció una estrategia de síntesis que mantiene la presencia del sistema cetónico predominante de tipo chalcona, moléculas de gran interés biológico(Awad et al, 1960).

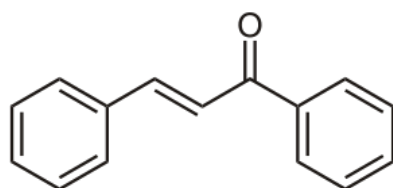


Figura 8. Estructura de la chalcona

Las chalconas son compuestos de una gran reactividad debido a la presencia de dos centros electrofílicos, los cuales actúan como una sola unidad o de manera independiente lo que les permite a los sistemas el ataque de nucleófilos y la posibilidad de sufrir reacciones de adición (Insuasty, 2016). Es sabido que las chalconas juegan un papel importante en productos naturales ya que forman parte del núcleo central de una variedad de compuestos de origen natural, que han mostrado actividades biológicas tales como antidiabética, antineoplásica, antihipertensiva, anti-retroviral, antiinflamatoria, anti-parasitaria, antihistamínica, “antimalárica”, anti-oxidante y antifúngica, entre otras. Por lo tanto, considerando la importancia de los sistemas heterocíclicos nitrogenados como indol y los compuestos del tipo chalcona, se pretende lograr, como fue mencionado anteriormente, un efecto sinérgico que potencie la actividad biológica de los derivados sintéticos de tipo ditiocarbamato, especialmente su actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* y a la vez que reduzcan la incidencia de este fitopatógeno y que resulten amigables con el medio ambiente. Así, en esta tesis de pregrado, se presenta el estudio de compuestos análogos de brassinina, derivados de chalconas, como posibles agentes antifúngicos contra *Fusarium oxysporum* en condiciones de invernadero.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Evaluar el efecto de ditiocarbamatos de alquilo derivados de *L*-triptófano y vinilcetonas (análogos de chalcona) mediante ensayos de actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* frente al fitopatógeno *Fusarium oxysporum* en plántulas de *Physalis peruviana*.

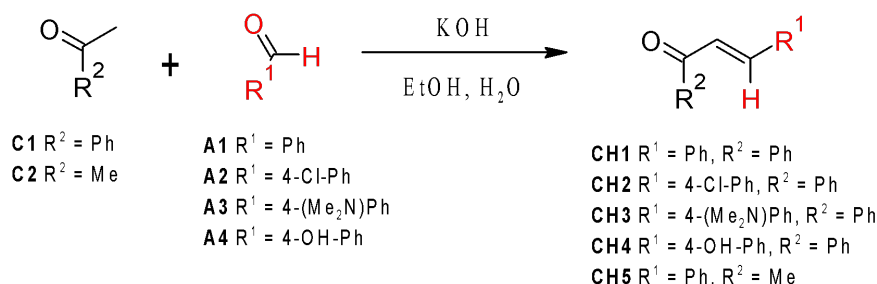
### Objetivos específicos

- Sintetizar ditiocarbamatos de alquilo a partir de *L*-triptófano y vinilcetonas.
- Evaluar el efecto de los compuestos obtenidos mediante ensayos *in vitro* de actividad antifúngica frente al fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.
- Seleccionar los compuestos obtenidos a partir de sus resultados de IC<sub>50</sub> para ensayos previos de actividad antifúngica frente al fitopatógeno *in vivo* en plantas de *Physalis peruviana* en condiciones de invernadero.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Fase laboratorio:



**Esquema 1. Síntesis de vinilcetona por condensación de Claisen-Schmidt entre cetonas (C1-C2) y aldehídos no enolizables (A1-A4)**

### Síntesis de vinilcetonas

Fueron usadas condiciones de la reacción de Claisen-Schmidt, según el siguiente procedimiento: una mezcla de hidróxido de potasio (KOH) (1 mmol), agua (5 mL), etanol (5 mL), acetofenona (**C1 ó C2**, 1 mmol) y el aldehído de interés (**A1-A4**, 1 mmol), se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 3 h. Luego, la mezcla de la reacción se mantuvo en refrigeración (0-4 °C) durante 12 h, tiempo después del cual se observó la formación de un precipitado. La mezcla de reacción fue filtrada aislando el precipitado, el cual fue lavado con agua fría (5x10 mL). El precipitado fue secado en una estufa a 50 °C, y finalmente fue purificado por recristalización de etanol. A continuación, se presentan los datos de caracterización de los productos obtenidos:

*Trans-chalcona* (**CH1**): Sólido amarillo, con punto de fusión entre 51-54 °C, rendimiento del 75%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, 1,4-dioxano. Insoluble en éter de petróleo y agua; espectro RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (*Aist*: Spectral Database for Organic Compounds, 2018a) en ppm: 8,00 (m, 2H), 7,78 (d, 1H), 7,52 (d, 1H), 7,65-7,37 (m, 6H); espectro RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (*Aist*: Spectral Database for Organic Compounds, 2018b) en ppm: 190,4, 144,8, 138,2, 134,9, 132,8, 130,5, 128,9, 128,6, 128,5, 128,4, 122,1.

*Trans-4-clorochalcona* (**CH2**): Sólido amarillo-verdoso, con punto de fusión entre 112-115 °C con descomposición, rendimiento del 83%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, 1,4-dioxano. Insoluble en éter de petróleo y agua; espectro RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (*Aist*: Spectral Database for Organic Compounds, 2018c) en ppm: 8,00 (d, 2H), 7,73 (d, 1H), 7,62-7,47 (m, 5H), 7,52 (d, 1H), 7,39 (d, 2H); espectro RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (*Aist*: Spectral Database for Organic Compounds, 2018d) en ppm: 190,1, 143,2, 138,0, 136,4, 133,4, 132,9, 129,6, 129,2, 128,6, 128,5, 122,5.

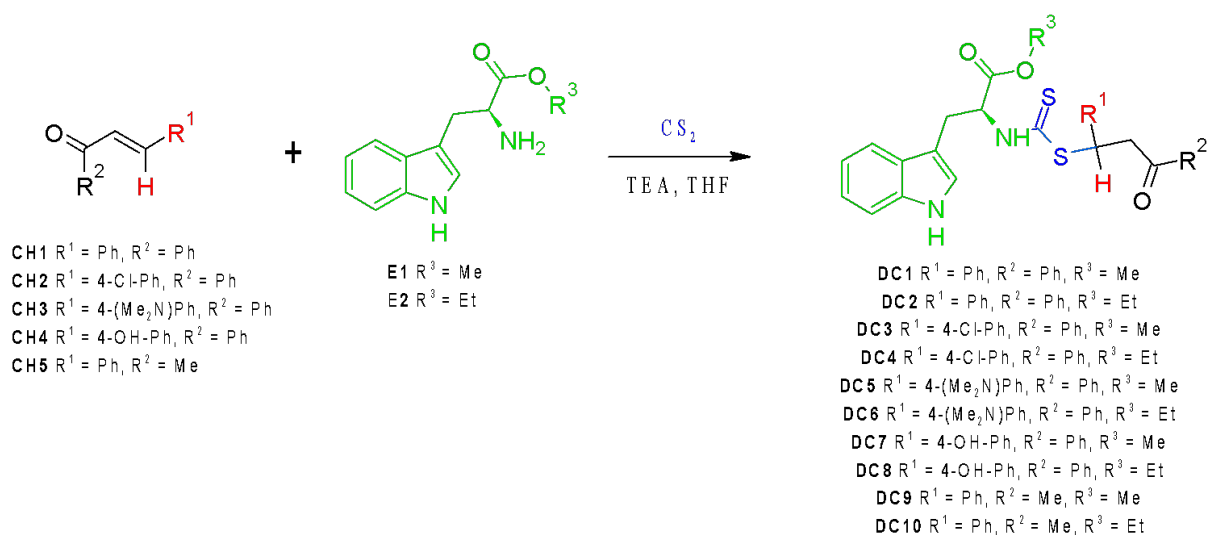
*Trans-4-(dimetilamino)chalcona* (**CH3**): Sólido rojizo, con punto de fusión entre 135-160 °C con descomposición, rendimiento del 34%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, 1,4-dioxano. Insoluble en éter de petróleo y agua; espectro RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (*Aist*: Spectral Database for Organic Compounds, 2018e) en ppm: 7,99 (d, 2H), 7,77 (d, 1H), 7,61-7,42 (m, 5H), 7,34 (d, 1H), 6,67 (d, 2H), 3,01 (s, 6H); espectro RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

(Aist: Spectral Database for Organic Compounds, 2018f) en ppm: 190,6, 152,0, 145,8, 139,1, 130,4, 128,4, 128,3, 122,6, 116,9, 111,8, 40,1.

**Trans-4-hidroxichalcona (CH4):** Sólido anaranjado, con punto de fusión entre 110-134 °C con descomposición, rendimiento del 27%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, 1,4-dioxano. Insoluble en éter de petróleo y agua; espectro RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 8,01 (d, 2H), 7,81 (d, 2H), 7,43-7,59 (m, 3H), 6,97 (d, 2H), 6,89 (d, 2H); espectro RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 193,1, 158,4, 145,2, 138,6, 132,9, 132,6, 130,7, 128,8, 128,6, 127,8, 119,9, 116,2, 116,1.

**Bencilidenacetona (CH5):** Sólido amarillo, con punto de fusión entre 35-40 °C con descomposición, rendimiento del 95%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, 1,4-dioxano. Insoluble en éter de petróleo y agua; espectro RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Aist: Spectral Database for Organic Compounds, 2018g) en ppm: 7,54 (m, 2H), 7,51 (d, 1H), 7,41-7,37 (m, 3H), 6,71 (d, 1H), 2,37 (s, 3H); espectro RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Aist: Spectral Database for Organic Compounds, 2018h) en ppm: 198,2, 143,4, 134,4, 130,5, 129,0, 128,2, 127,1, 27,5.

### Síntesis de ditiocarbamatos de alquilo derivados de vinilcetonas.



### Esquema 2. Síntesis de vinilcetona por condensación de Claisen-Schmidt entre cetonas (C1-C2) y aldehídos no enolizables (A1-A4)

Una mezcla de la respectiva vinilcetona (**CH1-5**, 1 mmol), disulfuro de carbono (1 mmol), y el respectivo éster en forma de clorhidrato (**E1** ó **E2**, 1 mmol), este último sintetizado previamente usando la metodología de Quiroga y colaboradores (2016), se agitó en 5 mL de THF a temperatura ambiente en presencia de trietilamina (2 mmol) durante 15 días a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El crudo de reacción fue sometido a cromatografía en columna clásica siendo purificado el producto de interés usando como adsorbente sílica gel y como fase móvil mezclas de polaridad creciente éter de petróleo/acetato de etilo. A continuación, se presentan los datos de caracterización de los productos obtenidos:

(((3-oxo-1,3-difenilpropil)tio)carbonotioil)-L-triptofanato de metilo (**DC1**): Sólido resinoso amarillo, rendimiento del 38%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Insoluble en éter de petróleo y agua; espectro RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 7,73 (s, 1H), 7,22 (m, 14H), 5,58 (t, 1H), 4,36 (t, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,70–3,60 (m, 1H), 3,45–3,20 (m, 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 203,90, 198,24, 185,10, 141,57, 137,00, 133,15, 133,00, 128,81, 128,56, 128,43, 128,39, 128,12, 128,01, 128,01, 127,83, 127,83, 127,51, 127,51, 127,10, 56,30, 52,17, 42,30, 42,27, 40,64, 30,05; análisis por CGEM: Perfil cromatográfico a tres tiempos de retención: 16,7 min (m/z: 207,25 [M- C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]), 17,3 min (m/z: 242,34 [M- C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S]), 19,1 min (m/z: 260,16 [M- C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>OS]).

(((3-oxo-1,3-difenilpropil)tio)carbonotioil)-L-triptofanato de etilo (**DC2**): Sólido resinoso amarillo, rendimiento del 44%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Insoluble en éter de petróleo y agua; análisis por CGEM: Perfil cromatográfico a tres tiempos de retención: 16,7 min (m/z: 207,12 [M-C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]), 17,3 min (m/z: 242,18 [M-C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S]), 19,1 min (m/z: 260,16 [M- C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>OS]).

(((1-(4-clorofenil)-3-oxo-3-fenilpropil)tio)carbonotioil)-L-triptofanato de metilo (**DC3**): Sólido resinoso amarillo, rendimiento del 55%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Insoluble en éter de petróleo y agua; espectro RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 9,16 (s, 1H), 7,71 (m, 13H), 6,80 (s, 1H), 5,48 (t, 1H), 4,42 (t, 1H), 4,00 (s, 3H), 4,10–3,75 (m, 3H), 3,70–3,50 (m, 1H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 200,21, 181,20, 173,49, 135,93, 127,51, 123,60, 123,58, 122,02, 122,01, 119,53, 119,50, 118,61, 118,59, 111,40, 111,40, 108,96, 108,96, 60,55, 57,09, 52,64, 29,80, 27,78, 14,29; análisis por CGEM: Perfil cromatográfico a tres tiempos de retención: 18,1 min (m/z: 242,19 [M-C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]), 18,7 min (m/z: 276,18 [M- C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S]), 19,1 min (m/z: 260,17 [M- C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>ClOS]).

(((1-(4-clorofenil)-3-oxo-3-fenilpropil)tio)carbonotioil)-L-triptofanato de etilo (**DC4**): Sólido resinoso amarillo, rendimiento del 49%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Insoluble en éter de petróleo y agua; análisis por CGEM: Perfil cromatográfico a tres tiempos de retención: 18,1 min (m/z: 242,17 [M-C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]), 18,7 min (m/z: 276,16 [M-C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S]), 19,5 min (m/z: 274,19 [M- C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>ClOS]).

(((1-(4-dimetilaminofenil)-3-oxo-3-fenilpropil)tio)carbonotioil)-L-triptofanato de metilo (**DC5**): Sólido resinoso amarillo, rendimiento del 36%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Insoluble en éter de petróleo y agua; espectro RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 8,01 (d, 2H), 7,96 (d, 1H), 7,60-7,30 (m, 7H), 7,27 (d, 1H), 6,65 (d, 2H), 6,50 (m, 1H), 5,32 (t, 1H), 4,35 (t, 1H), 4,04 (m, 1H), 3,77 (m, 1H), 3,34 (m, 1H), 3,10 (m, 1H), 3,03 (s, 6H), 2,80 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 199,13, 190,80, 175,01, 152,16, 145,98, 134,20, 132,24, 130,53, 128,65, 128,56, 128,42, 128,29, 122,75, 117,03, 112,95, 111,94, 111,89, 55,69, 52,17, 47,52, 46,42, 40,75, 40,21, 30,55; análisis por CG-EM: Perfil cromatográfico a dos tiempos de retención: 19,1 min (m/z: 260,12 [M-C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>NOS]), 21,6 min (m/z: 251,28 [M- C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]).

(((1-(4-dimetilaminofenil)-3-oxo-3-fenilpropil)tio)carbonotioil)-L-triptofanato de etilo (**DC6**): Sólido resinoso amarillo, rendimiento del 33%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Insoluble en éter de petróleo y agua; análisis por CG-EM: Perfil cromatográfico a dos tiempos de retención: 19,5 min (m/z: 274,17 [M-C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>NOS]), 21,7 min

(m/z: 251,25 [M-C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]).

(((1-(4-hidroxifenil)-3-oxo-3-fenilpropil)tio)carbonotioil)-L-triptofanato de metilo (**DC7**): Sólido resinoso amarillo, rendimiento del 31%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Insoluble en éter de petróleo y agua; espectro RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 9,85 (s, 1H), 7,79 (d, 2H), 7,60-6,50 (m, 13H), 5,53 (t, 1H), 4,32 (t, 1H), 3,80-3,40 (m, 6H), 3,13 (m, 2H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 200,21, 197,69, 172,45, 158,47, 136,95, 136,49, 132,71, 132,70, 129,41, 128,65, 128,44, 128,33, 124,37, 121,71, 120,13, 119,53, 116,49, 55,69, 52,17, 42,20, 46,00, 30,55; análisis por CG-EM: Perfil cromatográfico a dos tiempos de retención: 11,7 min (m/z: 121,19 [M-C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>]), 19,1 min (m/z: 260,31 [M-C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]).

(((1-(4-hidroxifenil)-3-oxo-3-fenilpropil)tio)carbonotioil)-L-triptofanato de etilo (**DC8**): Sólido resinoso amarillo, rendimiento del 30%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Insoluble en éter de petróleo y agua; análisis por CG-EM: Perfil cromatográfico a dos tiempos de retención: 11,7 min (m/z: 121,09 [M-C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>]), 19,5 min (m/z: 274,11 [M-C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]).

(((3-oxo-3-fenilpropil)tio)carbonotioil)-L-triptofanato de metilo (**DC9**): Sólido resinoso amarillo, rendimiento del 41%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Insoluble en éter de petróleo y agua; espectro RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 8,32 (s, 1H), 7,31 (m, 14H), 4,12 (t, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,60-3,30 (m, 2H), 2,10 (s, 3H), 3,09 (m, 2H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) en ppm: 213,07, 176,88, 171,31, 144,03, 141,07, 136,36, 128,76, 128,69, 127,56, 127,53, 126,99, 126,97, 126,90, 126,54, 111,47, 60,50, 54,61, 52,20, 40,62, 35,80, 31,21; análisis por CG-EM: Perfil cromatográfico a tres tiempos de retención: 11,6 min (m/z: 145,14 [M-C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]), 12,6 min (m/z: 180,13 [M-C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S]), 19,1 min (m/z: 260,13 [M-C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>OS]).

(((3-oxo-3-fenilpropil)tio)carbonotioil)-L-triptofanato de etilo (**DC10**): Sólido resinoso amarillo, rendimiento del 39%. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Insoluble en éter de petróleo y agua; análisis por CG-EM: Perfil cromatográfico a tres tiempos de retención: 11,6 min (m/z: 145,18 [M-C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]), 12,6 min (m/z: 180,14 [M-C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S]), 19,5 min (m/z: 260,13 [M-C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>OS]).

### **Ensayo de actividad antifúngica IN VITRO**

**Medio suplementado:** Una vez obtenidos las vinilcetonas **CH1-5** y ditiocarbamatos de alquilo **DC1-10**, se evaluó el efecto de cada uno de estos compuestos a 5 dosis diferentes (concentraciones entre 1 - 500 µg/mL), como valores experimentales, en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Para facilitar la disolución de los extractos en el medio PDA, los compuestos se pre disolvieron empleando una pequeña cantidad de Tween 20 (300uL) y luego se dispersaron por agitación mecánica en el medio PDA. Una vez colocado el medio con el tratamiento en la caja, se dejó gelificar y reposar durante 12 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó la siembra del patógeno (*Fusarium oxysporum* sp, cepa facilitada de la colección del Laboratorio de InQuibio de la UMNG) y se dejaron a temperatura ambiente por un par de días (72h) con el fin de permitir el desarrollo del hongo.

B: Blanco, PDA 0.5% y plug de Hongo.

P: Patrón (Fungicida comercial)  
Dithane.m-45

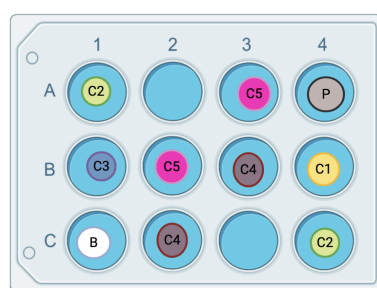
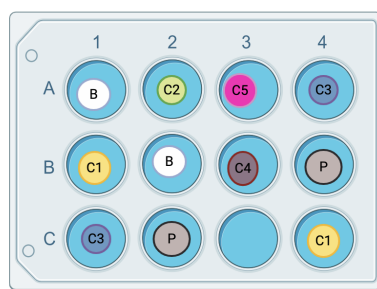
C1: Concentración 1  
(300ppm)

C2: Concentración 2  
(200ppm)

C3: Concentración 3  
(100ppm)

C4: Concentración 4  
(50ppm)

C5: Concentración 5  
(100ppm)



**Esquema 3.** Aleatorización de las concentraciones para cada uno de los compuestos sintetizados (CH1-CH5) y (DC1-DC10) y metodo de siembra en well plate.

El crecimiento micelial radial de las colonias de hongos se midió en comparación con el control, utilizando el software ImageJ. La inhibición del crecimiento micelial de los compuestos de prueba se calculó mediante la fórmula:  $\text{crecimiento inhibitorio (\%)} = (C - T) \times (100 / C)$ , donde C representa el diámetro del crecimiento fúngico en PDA no tratada, y T representa el diámetro de crecimiento fúngico en PDA tratada. Los datos de crecimiento de inhibición (%) se utilizaron para construir las curvas dosis-respuesta correspondientes para calcular las concentraciones inhibitorias semimáximas (IC<sub>50</sub> expresadas en mM) para cada compuesto, utilizando una regresión no lineal en el programa GraphPad Prism versión 5.00 (Software GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.) Para Windows.

### **Selección de ditiocarbamatos**

Una vez obtenidos los resultados de los ditiocarbamatos en los ensayos de actividad antifúngica, se seleccionaron los cuatro compuestos más promisorios, es decir los valores más bajos de IC<sub>50</sub> determinados a partir de los ensayos in vitro. Estos compuestos fueron: CH4, CH5, DC7, DC9, los cuales se pusieron a prueba en la fase de invernadero, según el siguiente protocolo:

Chalconas-Ditiocarbamatos	IC50 (mM)
CH1	52,81
CH2	9,63
CH3	15,66
<b>CH4</b>	<b>0,06</b>
<b>CH5</b>	<b>0,69</b>
DC1	1,28
DC2	0,41
DC3	5,74
DC4	1,46
DC5	0,43
DC6	1,30
<b>DC7</b>	<b>0,33</b>
DC8	1,12
<b>DC9</b>	<b>0,33</b>
DC10	1,57

**Tabla 2.** Valores de IC50 (mM) de las chalconas - vinilchetonas (CH1-CH5) y ditiocarbamatos (DC1-DC10)

### **Fase invernadero:**

Esta fase del proyecto se realizó en las instalaciones de la Universidad Militar Nueva Granada sede Campus, en el invernadero de fitopatología molecular, de la División de Laboratorios, para las pruebas bajo condiciones controladas.

### **Material Microbiológico**

Los aislamientos del patógeno (*Fusarium oxysporum*), que se utilizaron en este estudio se obtuvieron de una cepa facilitada de la colección del Laboratorio INQUIBIO de la UMNG. Los aislamientos se mantuvieron en PDA 100% agar papa dextrosa (Becton Dickinson), en cajas de Petri (Ø 56 mm).

### **Material Vegetal**

Las semillas se obtuvieron directamente de frutos, a estas se les retiró el exceso de mucílago y se limpiaron, luego fueron suspendidas en 500mL de agua estéril junto con 1g de carbón activado en polvo como método pregerminativo (Este tratamiento duró aproximadamente 1 semana).

Una vez acabado el tiempo de reposo del tratamiento pregerminativo se tomó cada semilla y se introdujo en bandejas de germinación que previamente estaban preparadas con turba. Se distribuyeron en cada pozo de la bandeja una semilla con un total de 300 pozos llenos (300 semillas de uchuva). Después de 2 meses se obtuvo resultados en la germinación de plantas de uchuva, y dos meses luego cuando estaban en un tamaño adecuado, se trasplantaron en bolsas de 1Kg con una mezcla de tierra- cascarilla (8:2).

### **Fertilización**

Se hizo uso de la Solución hidropónica Hoagland, esta solución proporciona todos los nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas y es apropiado para una amplia gama de especies de plantas. Se preparó 100L de la solución, cada 100mL eran distribuidos en el suelo por plántula. Se realizaron 5 aplicaciones de la solución durante el proceso de crecimiento y adaptación de la planta.

### **Análisis de fitotoxicidad in vitro**

*Metodología seguida de (Alzate et al., 2009)*

En este análisis se diseñó un método experimental en el cual se pudiera determinar un posible efecto tóxico causado por los compuestos (chalconas y ditiocarbamatos derivados de chalconas), para determinar este posible efecto se hizo uso de hojas de plantas sanas de uchuva las cuales se tomaron directamente de la planta y se distribuyeron en diferentes cajas de petri con condiciones de humedad propicias para las hojas.

**Aplicación:** Con el uso de una jeringa de insulina se tomó una cantidad aproximada de 1mL del compuesto, se realizó una localización (Sección de aplicación del compuesto) del punto de análisis del compuesto y se dispersó el compuesto por la zona marcada con la aguja de la insulina. La concentración del compuesto fue determinada respecto al mejor IC50 en respuesta a los ensayos inVitro (Tabla 2).



**Figura 9.** Ensayo de análisis de fitotoxicidad in vitro con hojas previamente marcadas e inyectadas con los compuestos de selección en el estudio.

Las cajas de petri con las hojas se ubicaron en un mesón en condiciones de laboratorio con temperatura ambiente. Se evaluaron 4 dispersiones preparadas con los compuestos (CH4, CH5, DC7 y DC9, y un control sin ninguna dispersión). Se adicionaron 300 uL de tensoactivo (Tween 20) por cada 5mg del compuesto, esto para mejorar la solubilidad de los compuestos. La aplicación se realizó por triplicado sobre las hojas, y la aplicación era aleatoria (Venación, margen, base, ápice). Se examinó la aparición de posibles lesiones en el tejido expuesto a las alícuotas de la emulsión y para ello se hizo uso de una escala de daño donde: 0: Ningún daño aparentemente igual al control; 1: Daño apenas perceptible (amarillamiento zonal); 2: Necrosamiento leve, y 3: Necrosamiento acentuado y/o perdigoneo. Este ensayo duró aproximadamente 12 días y no se observó ningún daño por los compuestos ditiocarbamatos.





**Figura 10.** Suspensión de esporas en medio CZAPEK

## ***Inoculación***

### **Suspensión de esporas**

Se realizó una suspensión de esporas en medio CZAPEK DOX, es un medio semisintético que contiene nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno. Posee la ventaja de una formulación químicamente definida.

Se preparó 1L del medio líquido, se esterilizó y se introdujo micelio de *Fusarium oxysporum* monospórico. Se dejó en un Shaker temperado (T 27,0 C) (100 RPM) durante una semana. Luego se realizó el conteo de conidias en una suspensión acuosa de esporas mediante el uso de la cámara de Neubauer hasta realizar un conteo igual o mayor a  $1 \times 10^6$

### **Inoculación del fitopatógeno**

Para este proceso se llevó a cabo dos métodos de inoculación para conducir la infección del fitopatógeno de manera más eficaz.

#### ***Inyección en corona de la raíz***

Consiste en la inyección de 1 mL de suspensión conidial concentrada de  $1 \times 10^6$  conidios por  $\text{mL}^{-1}$ . de agua destilada estéril con jeringas para insulina de 1 mL

#### ***Inmersión de las raíces***

Esta inoculación se hizo siguiendo la metodología propuesta por Williams (1981) y Estupiñán y Ossa (2007). Se hizo un lavado de las raíces con agua de grifo y con unas tijeras estériles se cortaron los ápices de la raíz principal. Posteriormente, cada una de las plántulas se sumergió hasta el cuello de la raíz durante 30 minutos en vasos de precipitación que contenían 100 mL de la suspensión conidial concentrada de  $1 \times 10^6$  conidios por  $\text{mL}^{-1}$ .

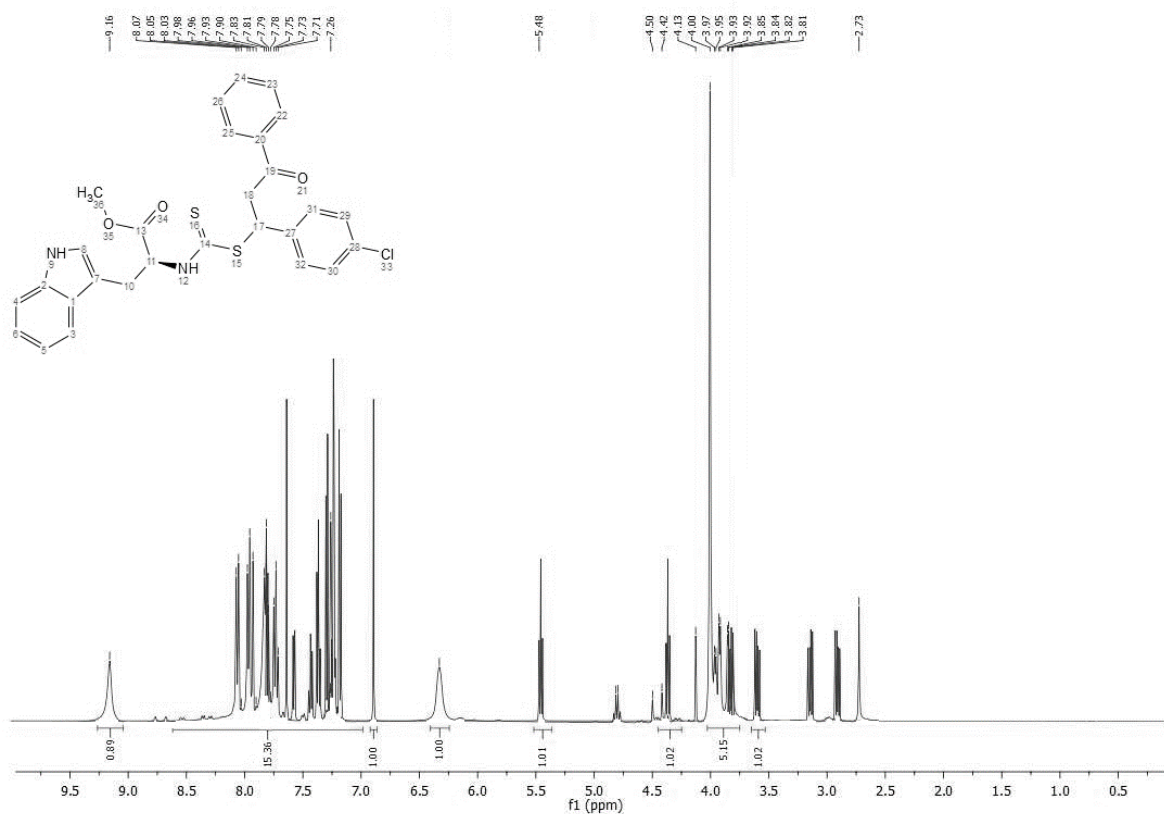
### **Análisis estadístico**

Se realizaron pruebas ANOVA, luego de ello una homogeneidad de varianzas y una comparación múltiple utilizando las pruebas de TUKEY.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

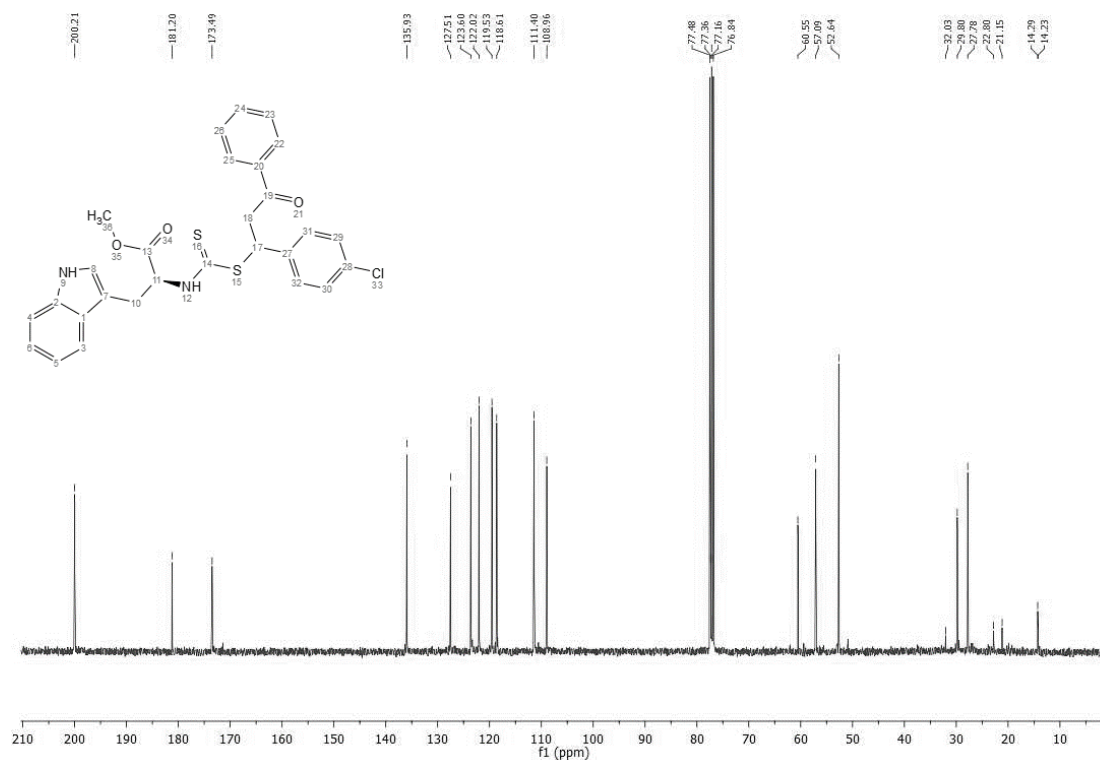
La síntesis de vinilcetonas del tipo (E)-chalcona **CH1-5** fue llevada a cabo empleando condiciones suaves de reacción, logrando obtener los compuestos de interés con buenos porcentajes de rendimiento. Los valores de porcentaje de rendimiento obtenido para cada compuesto muestran una dependencia respecto al carácter electrónico del sustituyente en posición *para* del anillo aromático en el aldehído precursor. Por ejemplo, para el caso de la reacción con el precursor 4-clorobenzaldehído (**R = Cl**), en el cual dicho grupo es un electroattractor de electrones, el porcentaje de rendimiento para la obtención de **CH2** fue alto. Sin embargo, para el caso de las reacciones de los precursores 4-dimetilaminobenzaldehído y 4-hidroxibenzaldehído, en los cuales el sustituyente del anillo aromático corresponde a grupos electrodonores, el porcentaje de rendimiento es considerablemente menor. Estas variaciones en los porcentajes de rendimiento respecto a la naturaleza electrónica del grupo se explican a partir de los efectos inductivos y mesoméricos que pueden ser causados sobre el aldehído y su reactividad. La presencia de grupo electroattractores de electrones tiende a aumentar el carácter electrofílico del aldehído precursor, haciendo más propenso y efectivo el ataque del nucleófilo, en este caso representado por el respectivo ion enolato generado a partir de la deprotonación de la cetona de partida. Para grupos electrodonores, los efectos inductivos y mesoméricos no incrementan la electrofilicidad del grupo aldehído al contrario, la reducen al aumentar la densidad electrónica local del grupo R-CHO.

Una vez obtenidas las vinilcetonas **CH1-5**, se procedió con la reacción entre este tipo de precursores, disulfuro de carbono y los ésteres de alquilo derivados del aminoácido *L*-triptófano. Para esto, se empleó la metodología propuesta por Quiroga y colaboradores (2016), sin embargo, fue necesario emplear la metodología que describe la reacción en dos etapas: síntesis de los ésteres de alquilo derivados de *L*-triptófano según el protocolo de Li y Sha (2008) con un rendimiento cuantitativo; una segunda etapa de reacción de dichos ésteres con cada precursor **CH1-5** y disulfuro de carbono. Se observó que únicamente después de 15 días bajo agitación a temperatura ambiente se da formación de los productos de interés **DC1-10**, con rendimientos entre bajos y moderados (30-55%). Los productos fueron purificados usando cromatografía en columna clásica para su posterior caracterización usando resonancia magnética nuclear (RMN) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Los resultados del compuesto **DC3** son descritos a continuación, sin embargo, es importante resaltar que únicamente fue posible medir los espectros RMN de los derivados del éster metílico de *L*-triptófano (**DC1**, **DC3**, **DC5**, **DC7** y **DC9**) por motivos de la pandemia COVID-19.



**Figura 11. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto DC3**

El espectro de RMN <sup>1</sup>H de **DC3** (Figura 11) presenta varias señales características que permiten realizar su adecuada caracterización. En primer lugar, se observa un grupo de señales solapadas entre sí, entre 3,5-4,50 ppm, las cuales aparecen como dobles dobles (dd), un triplete (t) y como una señal singulete (s). Estas señales fueron asignadas a cuatro tipos de átomos de hidrógeno: las señales dd corresponde a los hidrógenos sobre grupos metileno adyacentes a carbonos quirales, los cuales se encuentran tanto en el fragmento proveniente del grupo éster como al proveniente a la (*E*)-chalcona, con numeración química 3 y 2'; la señal singulete corresponde al grupo metilo del éster, la cual debería integrar para 3 átomos de hidrógeno y la señal en forma de t correspondiente al átomo de hidrógeno del grupo metilo unido directamente al átomo de azufre. La señal que aparece en 5,48 ppm como un multiplete fue asignada a la señal del átomo de hidrógeno del carbono quiral. Finalmente, entre 6,75 y 8,25 ppm se encuentran las señales correspondientes a los átomos de hidrógeno de los anillos aromáticos tanto en los grupos fenilo como en el fragmento indol de la molécula. Los resultados obtenidos para los derivados **DC1,5,7 y 9** muestran un comportamiento similar.



**Figura 12. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto DC3**

Por otro lado, el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 12) permitió confirmar la estructura propuesta. Dada la presencia de 23 señales diferentes en el espectro, es posible afirmar que la molécula únicamente posee simetría en el anillo con presencia del sustituyente  $\text{R}=\text{Cl}$ , un sistema  $p$ -sustituido, mostrando únicamente cuatro señales para dichos átomos de carbono que aparecerán en diferentes desplazamientos químicos. Entre 14 y 61 ppm aparecen las señales correspondientes a los átomos de carbono de la parte alifática de la molécula, mientras que arriba de 100 ppm aparecen los diferentes átomos de carbono de tipo aromático y aquellos con enlaces  $\text{C}=\text{O}$  y  $\text{C}=\text{S}$ . Específicamente, las señales que aparecen más desplazadas en el espectro fueron asignadas a los grupos  $\text{C}=\text{O}$  de cetona y éster de ácido carboxílico, como al grupo  $\text{C}=\text{S}$  del ditiocarbamato de alquilo (entre 170 y 205 ppm).

Con el fin de llevar a cabo una completa caracterización de los productos obtenidos y evaluar su pureza química, cada uno de los compuestos **DC1-10** fueron analizados por CG-EM. A continuación, se presentan los resultados obtenidos para el compuesto **DC3**. El cromatograma del compuesto **DC3** (Figura 11) muestra tres picos diferentes mayoritarios con tiempos de retención diferentes, resultado que no era esperado dados los resultados obtenidos por RMN. De acuerdo con los respectivos espectros de masas, los picos fueron identificados como un fragmento tipo **CH2**, tipo 1,3-difenil-3-sulfanilpropan-1-ona y tipo 2-isotiocianato, respectivamente.

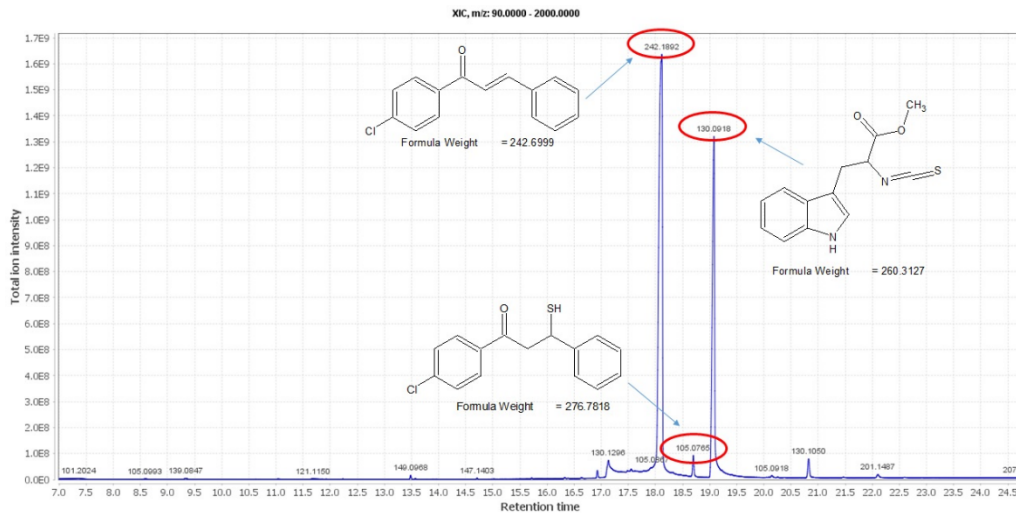


Figura 13. Perfil CG-EM del compuesto DC3

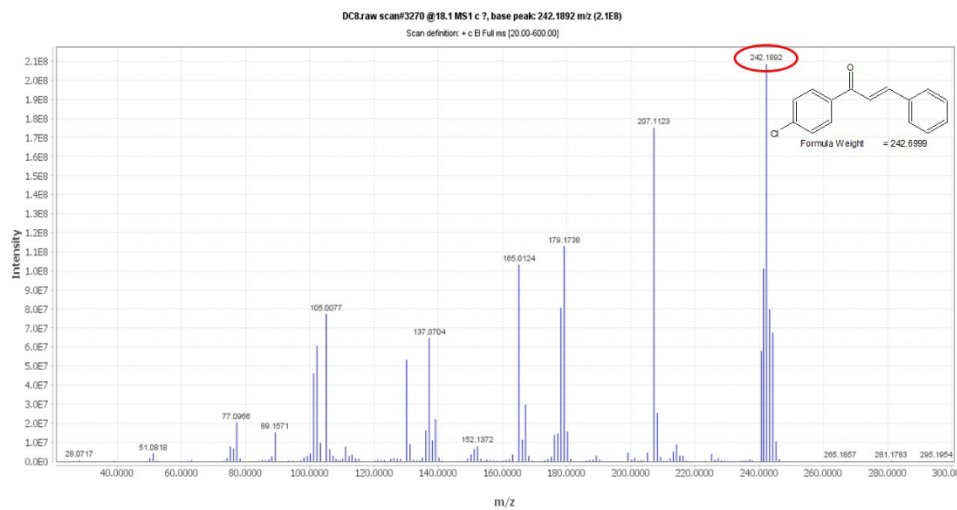


Figura 14. Espectro CG-EM a tiempo de retención 18,1 min del compuesto DC3

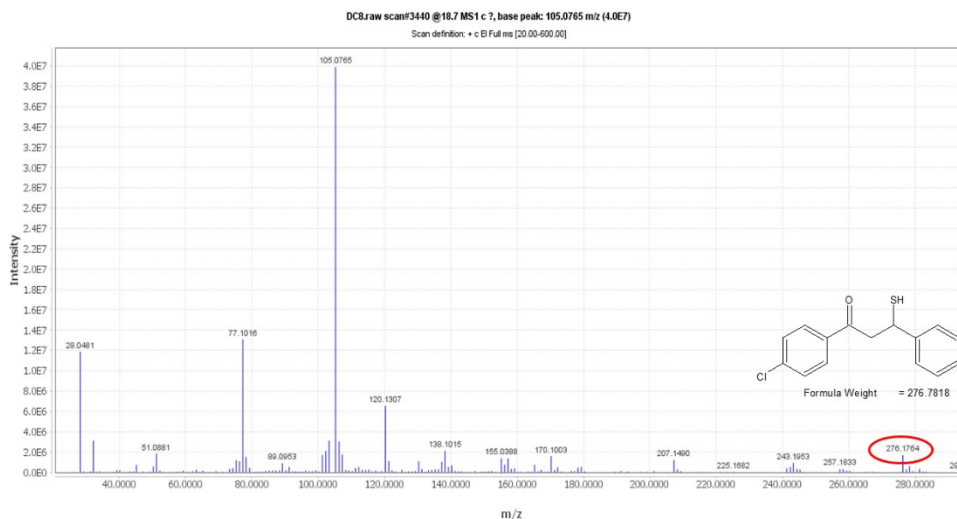
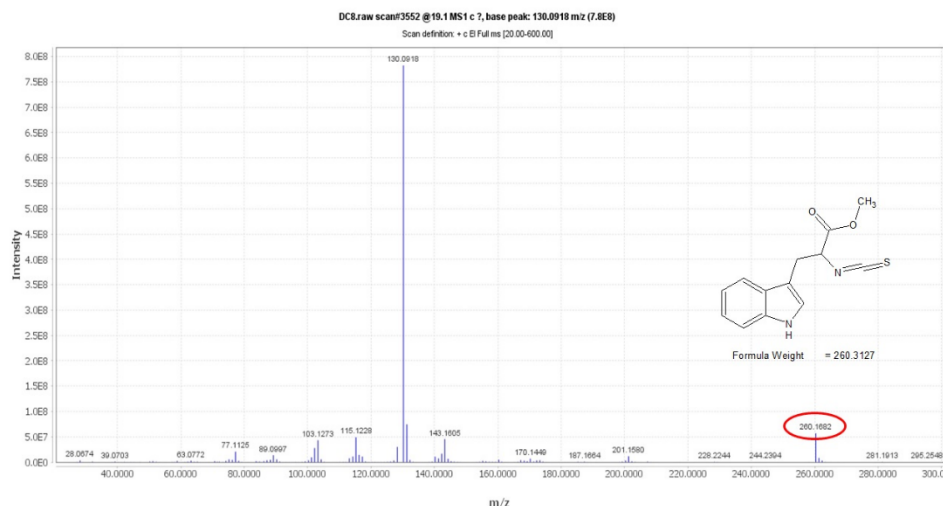


Figura 15. Espectro CG-EM a tiempo de retención 18,7 min del compuesto DC3



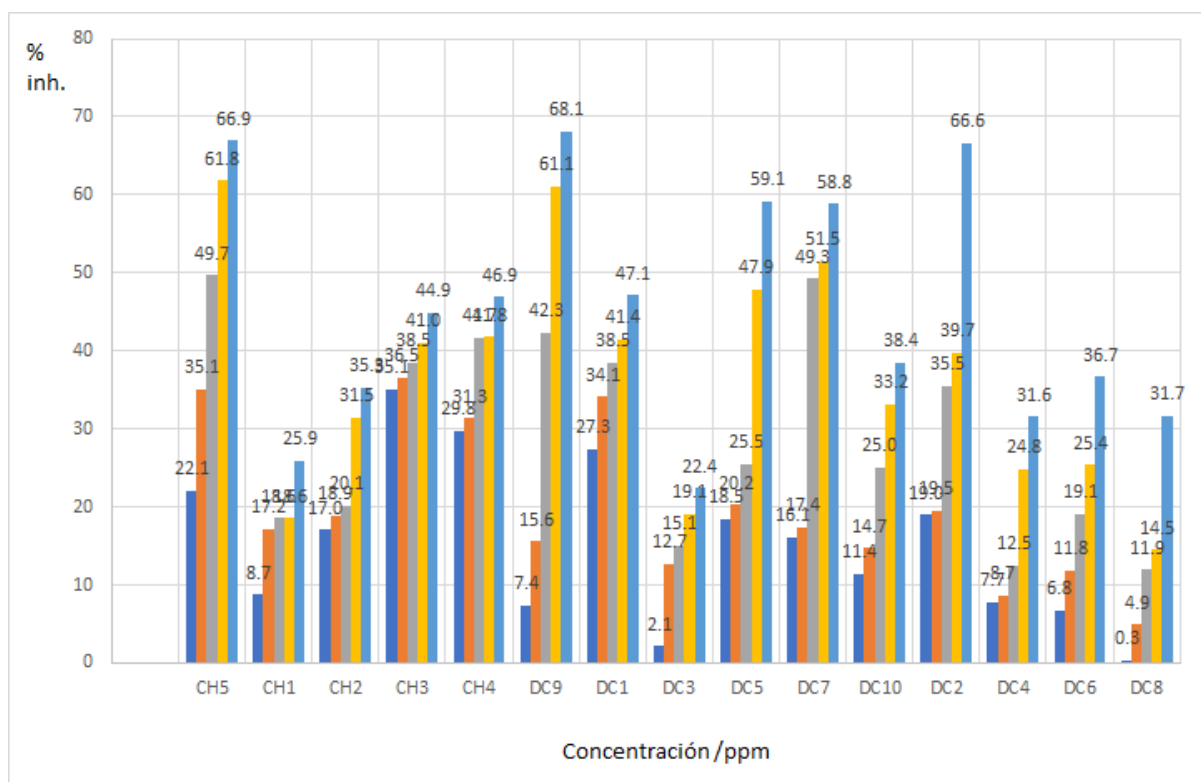
**Figura 16. Espectro CG-EM a tiempo de retención 19,1 min del compuesto DC3**

De acuerdo con los resultados obtenidos por CG-EM, es posible afirmar que los compuestos tipo **DC1-10** son termolábiles y sufren reacciones de ruptura del grupo ditiocarbamato de alquilo en el inyector del equipo de CG dada su alta temperatura. Este comportamiento se encontró para todos los derivados **DC1-10**, lo cual se puede evidenciar en los espectros de masas por impacto electrónico de cada señal en el cromatograma, presentes en los anexos de esta tesis.

Respecto a la reacción ocurrida para la formación de los derivados **DC1-10**, se encontraron diferencias en los porcentajes de rendimiento de los productos obtenidos, las cuales pueden asociarse a las condiciones de reacción y a consideraciones estructurales de la vinilcetona de partida que determinan el avance de la reacción. Las reacciones que fueron realizadas durante tiempos de reacción más largos que 15 días presentaron porcentajes de rendimiento más bajos y mayor número de subproductos en todos los casos estudiados. Lo anterior demuestra que el número de reacciones colaterales incrementa dada la degradación de los compuestos **DC1-10**, los cuales no son tan estables como los derivados obtenidos por Quiroga y colaboradores en 2016 y 2019. Por otro lado, se evidencia que, independientemente de las condiciones de reacción empleadas en presencia o ausencia de disolvente, existe una tendencia en los valores de porcentaje de rendimiento, observándose correlación con el carácter los grupos sustituyentes del anillo aromático del aldehído de partida. Los valores de porcentaje de rendimiento decrecen cuando la contribución electrónica de los sustituyentes es mayor, particularmente cuando se emplean vinilcetonas con grupos electrodonadores de anillo. Por otro lado, cuando se emplean vinilcetonas con grupos electroattractores, la electrofília de la misma aumenta, favoreciendo la reacción de adición de Michael del respectivo ion ditiocarbamatos intermediario. Con el fin de buscar una metodología que permitiera la síntesis de los compuestos **DC1-10** con un mayor porcentaje de rendimiento, las reacciones también fueron realizadas en ausencia de disolvente y calentamiento convencional a 50 °C, sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que esta estrategia aunque reduce los tiempos de reacción, no mejora los porcentajes de rendimiento, al contrario tienden a ser menores. En términos generales, la formación de compuestos del tipo **DC1-10** presenta porcentajes de rendimiento de moderados a bajos comparados con los análogos obtenidos previamente de tipo vinilcetona, presumiblemente

por el impedimento estérico involucrado en la reacción de adición de Michael enunciada para el mecanismo de reacción, tal como lo describe Quiroga y colaboradores (2016).

Una vez obtenida la caracterización y las respectivas moléculas se realizaron pruebas biológicas de estas frente a el hongo fitopatógeno en estudio *Fusarium oxysporum*. En estas pruebas se incluyeron los precursores CH1-5 y los compuestos DC1-DC10 de los cuales se pudo obtener un valor de inhibición por crecimiento micelial, en donde fue evaluado el efecto antifúngico tanto de los precursores tipo vinilcetona como de los DC.



Gráfica 1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del hongo *Fusarium oxysporum* a las concentraciones de 10, 50, 100, 200 y 300 ppm de los compuestos CH1-5 y DC-10, donde el color azul oscuro representa la concentración más baja 10ppm, el color naranja 50ppm, el color gris la concentración de 100ppm, el color amarillo 200ppm y la última barra de color azul celeste la concentración máxima utilizada en este estudio 500ppm.

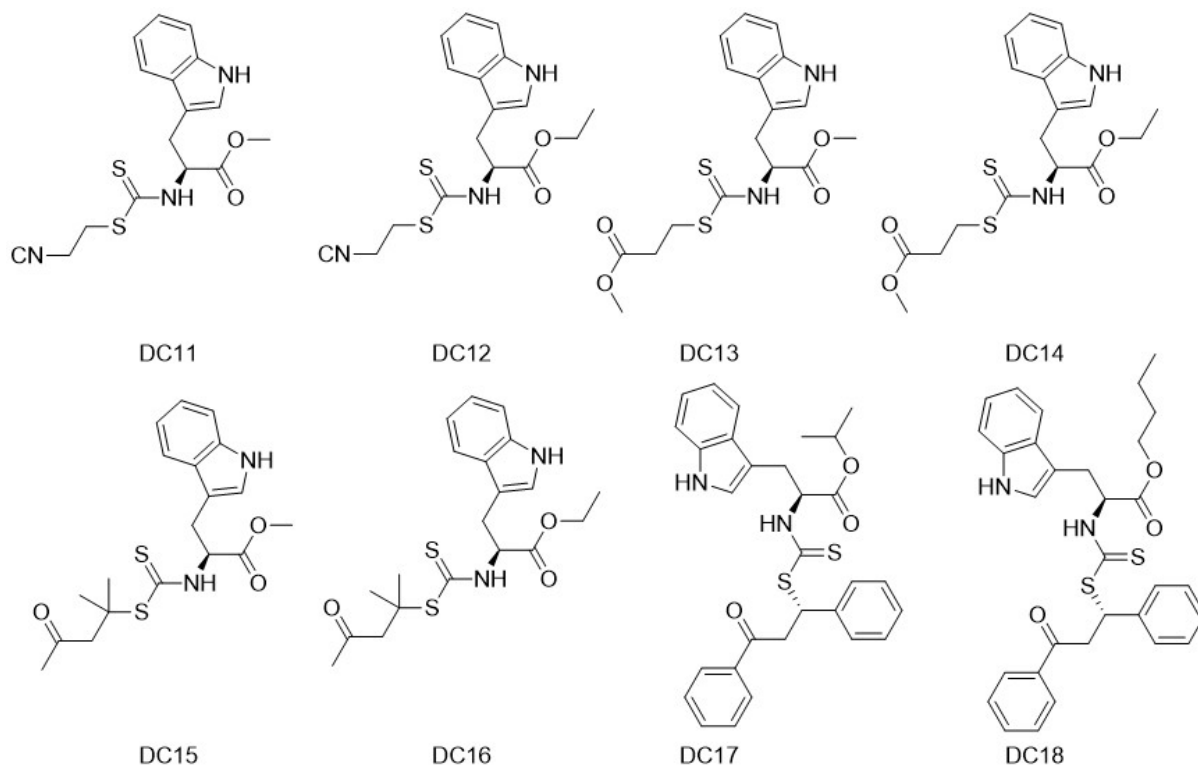
En la Gráfica 1 se muestran los diferentes porcentajes de inhibición según su concentración en donde se establece que para los ditiocarbamatos de alquilo derivados de CH4 y CH5, así como del éster metílico del *L*-triptófano, se presenta un mayor porcentaje de inhibición comparado con los demás ditiocarbamatos. El DC9 se destaca por generar una inhibición constante puesto que a 100 ppm de un 40-50% y en su mayor concentración de un 60-65%, actuando con buenos porcentajes en las diferentes concentraciones, además que se evidencia un comportamiento muy similar respecto al mostrado por CH5, su precursor, lo cual sugiere que este fragmento estructural puede ser considerada como potencial farmacóforo. La tendencia encontrada en DC2 derivado del éster etílico evidencia que la presencia del radical etilo favorece el comportamiento antifúngico incluso en concentraciones mínimas

como lo son 10ppm-50ppm (alrededor del 20%), sin embargo no es una tendencia que se observe en los restantes derivados DC4, DC6 y DC8, que muestran porcentajes de inhibición muy bajos, sino exclusivamente para este compuesto, obtenido a partir de CH1, por lo que no es posible obtener una conclusión contundente respecto al efecto del tamaño del grupo éster en los valores de porcentaje de inhibición. Por otro lado, se ve el efecto contrario en ciertos derivados del éster metílico como DC1 y DC3, que no muestran inhibiciones importantes en las concentraciones evaluadas. En la tabla 2 se presentan los valores de IC50 para los compuestos evaluados. El IC50 representa la concentración de un compuesto que se requiere para una inhibición del 50% (Motulsky et al, 2003).

De esta manera la inhibición para el precursor CH5 es buena según su valor de IC50, siendo comparable con su derivado DC9 y mejor que la mostrada por DC10. Así mismo los compuestos derivados de DC7 y DC9 tuvieron una capacidad de inhibición alta en cuanto al crecimiento micelial mucho mayor como en el caso del compuesto DC2 y DC5, que tuvieron uno de los valores en IC50 similares pero porcentajes de inhibición menores a la mayor concentración usada. De esta manera se puede decir que los compuestos DC7 y DC9 con grupos hidroxilo y un solo anillo en el fragmento derivado de chalcona, respectivamente, son compuestos que tienen una buena capacidad inhibitoria, la cual aparentemente se pierde con la presencia de grupos hidrocarbonados en el fragmento COOR.

Sin embargo, con el fin de entender el efecto de la variabilidad estructural en los compuestos DC1-10, se realizó un estudio de Correlación Estructura-Actividad (QSAR), usando diferentes metodologías. Es sabido que los modelos de relación estructura-actividad (SAR) y de relación cuantitativa entre estructura y actividad (QSAR), son modelos matemáticos que pueden utilizarse para predecir las propiedades de destino fisicoquímicas, biológicas y ambientales de los compuestos a partir del conocimiento de su estructura química. Sin embargo, los resultados obtenidos por QSAR deben validarse empleando diversos métodos y deben caer dentro del ámbito de aplicabilidad de los modelos usados. Para llevar a cabo un estudio de tipo QSAR se necesitan básicamente tres tipos de información: (A) Estructura molecular de diferentes compuestos que tengan un mismo mecanismo de acción (farmacodinamia), y por lo tanto se consideran como ligandos ante una diana biomolecular común; (B) Datos de actividad biológica de cada uno de los ligandos incluidos en el estudio (por ejemplo: DE50, DL50, Ki, IC50, etc.) y (C) Propiedades fisicoquímicas (descriptores numéricos) de los ligandos calculados por medios computacionales a partir de la estructura molecular generada *in silico*. En esta tesis se cuenta con el valor medido de IC50 de los compuestos DC1-10 y sus respectivas estructuras moleculares optimizadas, los cuales fueron discutidas previamente. Esto debido a que los datos de actividad biológica deben provenir de un ensayo a las mismas condiciones, lo cual reduce en cierta medida el error humano en las mediciones experimentales (Lozano-aponte y Scior, 2012). Para complementar un grupo de 18 compuestos en total, con el cual incrementar el ambiente químico a estudiar y realizar estudios QSAR, se usaron los valores de IC50 reportados por Quiroga (2016) y Angarita-Rodríguez (2019), para los ditiocarbamatos de alquilo DC11-DC18 (Figura 15).





Compuesto	IC50 (mM)
DC11	2,50
DC12	0,16
DC13	2,10
DC14	1,10
DC15	0,59
DC16	1,70
DC17	1,23
DC18	0,44

Figura 17. Compuestos DC11-18 usados para cálculos QSAR con su valores de IC50

Además, fueron usadas varias metodologías, las cuales se presentan a continuación. Inicialmente se usó el método QSAR GAUSSIAN, con un set de entrenamiento del 70% y un set de prueba del 30% con alineamiento flexible de los ligandos DC1-DC10. Este método se caracteriza por usar modelos de regresión basados en el método de procesos gaussianos (GP), los cuales son métodos poderosos y robustos para la regresión no lineal. Además, no requieren la determinación subjetiva de los parámetros del modelo, siendo capaces de manejar una gran cantidad de descriptores y seleccionar los importantes, siendo inherentemente resistentes al sobreentrenamiento y ofreciendo una forma de estimar la incertidumbre en las predicciones (Obrezanova y Segall, 2010)

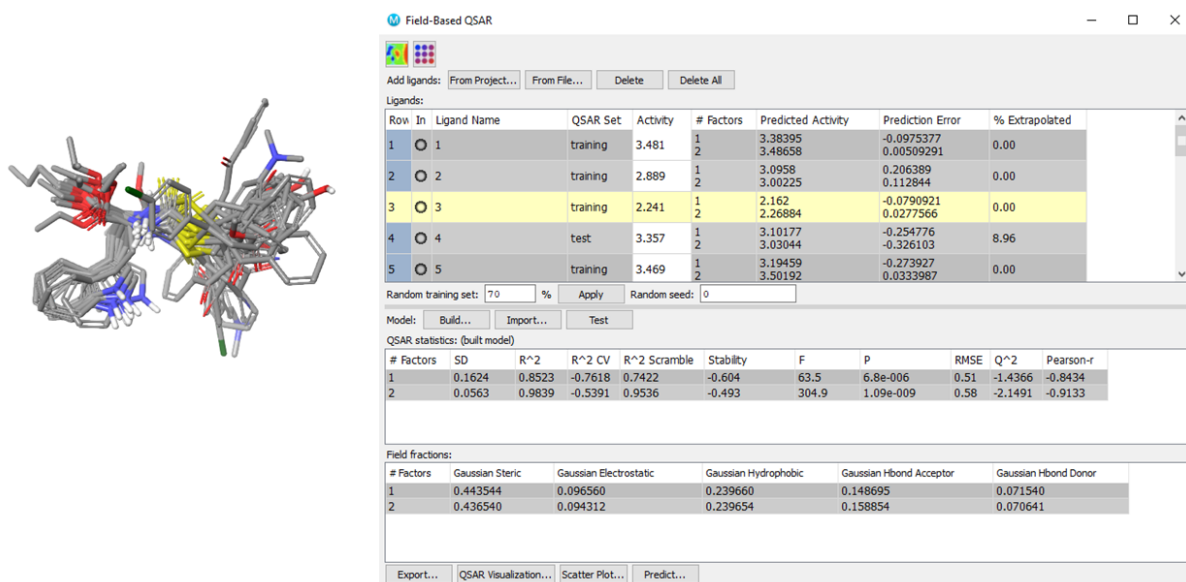


Figura 18. Parámetros y alineamiento realizado para compuestos DC1-18 para el método QSAR GAUSSIAN

Empleando este método, para dos factores se obtuvo un valor de R<sup>2</sup> scramble de 0.9536, mostrando un buen ajuste de los datos a la regresión usada, la cual se presenta en la Figura 18. Este tipo de resultados permiten visualizar gráficamente el efecto de diversos factores estructurales que pueden afectar la actividad biológica, en este caso el comportamiento como antifúngicos de los compuestos DC1-DC18. Los factores electrostáticos, que corresponden a la presencia de densidad electrónica o ausencia de ella en localidades de la estructura, afectada por diferentes grupos donores o electroattractores de electrones, puede visualizarse a partir de la presencia de regiones azules para grupos electropositivos pueden aumentar la actividad, y regiones rojas para grupos electronegativos mejoran la actividad. La presencia de grupos NH, OH o HF, caracterizados por su comportamiento como donores o aceptores de puente de hidrógeno, también puede ser evaluada, de tal forma que la presencia de localidades que se comporten como aceptores de puentes de H (HBA), se visualiza como regiones rojas, por lo general ubicando grupos que conducen a una mejor actividad; y regiones magenta, que evidencian la presencia de grupos HBA reducen la actividad. Por otro lado, los grupos donores de puente de H (HBD) que favorecen la actividad se refleja en la presencia de regiones azul-violeta mientras que regiones azules evidencian áreas desfavorecidas por dichos grupos. La naturaleza hidrofóbica de los grupos funcionales asociados a las estructuras de DC1-18 puede ser evaluada en los diagramas de contorno, de tal forma que regiones grises muestran grupos hidrofóbicos en regiones que desfavorecen la actividad mientras que regiones amarillas muestran grupos hidrofóbicos en regiones que favorecen la actividad. Finalmente, los efectos estéricos, relacionados con el tamaño de los grupos funcionales presentes y demás cadenas hidrocarbonadas, tiende a estar visualizado a partir de regiones verdes con efecto favorable de sustituyentes voluminosos sobre la actividad biológica. El diagrama de contorno del alineamiento flexible obtenido, Figura 19b, evidencia que las localidades vecinas a los grupos RCOOR y uno de los grupos arilo del fragmento proveniente de los compuestos CH1-5 unidos a la cadena hidrocarbonada derivada de la insaturación, deben presentar un tamaño mayor para mejorar la actividad biológica, es decir un mayor efecto estérico. Desde un punto de vista electrónico, las localidades asociadas a los anillos aromáticos derivados de CH1-5 deben preferiblemente presentar grupos

electropositivos mientras que la región asociada al grupo N-CS<sub>2</sub>-R estaría influenciada por la presencia de grupos electronegativos que puedan mejorar la actividad biológica. Las implicaciones estructurales de tipo hidrofóbico son fuertes en las regiones asociadas al fragmento hidrocarbonado derivado de los precursores CH1-5 y no necesariamente en las regiones provenientes del aminoácido usado, en este caso L-triptófano, demostrando que posiblemente la actividad antifúngica de estos compuestos depende fuertemente del precursor vinilcetona usado y no fuertemente del aminoácido de partida, lo cual fue propuesto por Quiroga y colaboradores (2019). Finalmente, respecto a grupos que puedan comportarse como donores o aceptores de puente de hidrógeno, la presencia de los mismos en las vecindades de los grupos RCOOR y R-NCS<sub>2</sub>-R mejoraría la actividad biológica para este tipo de compuestos, mientras que no sería favorable su presencia en el fragmento hidrocarbonado derivado de la vinilcetona de partida.

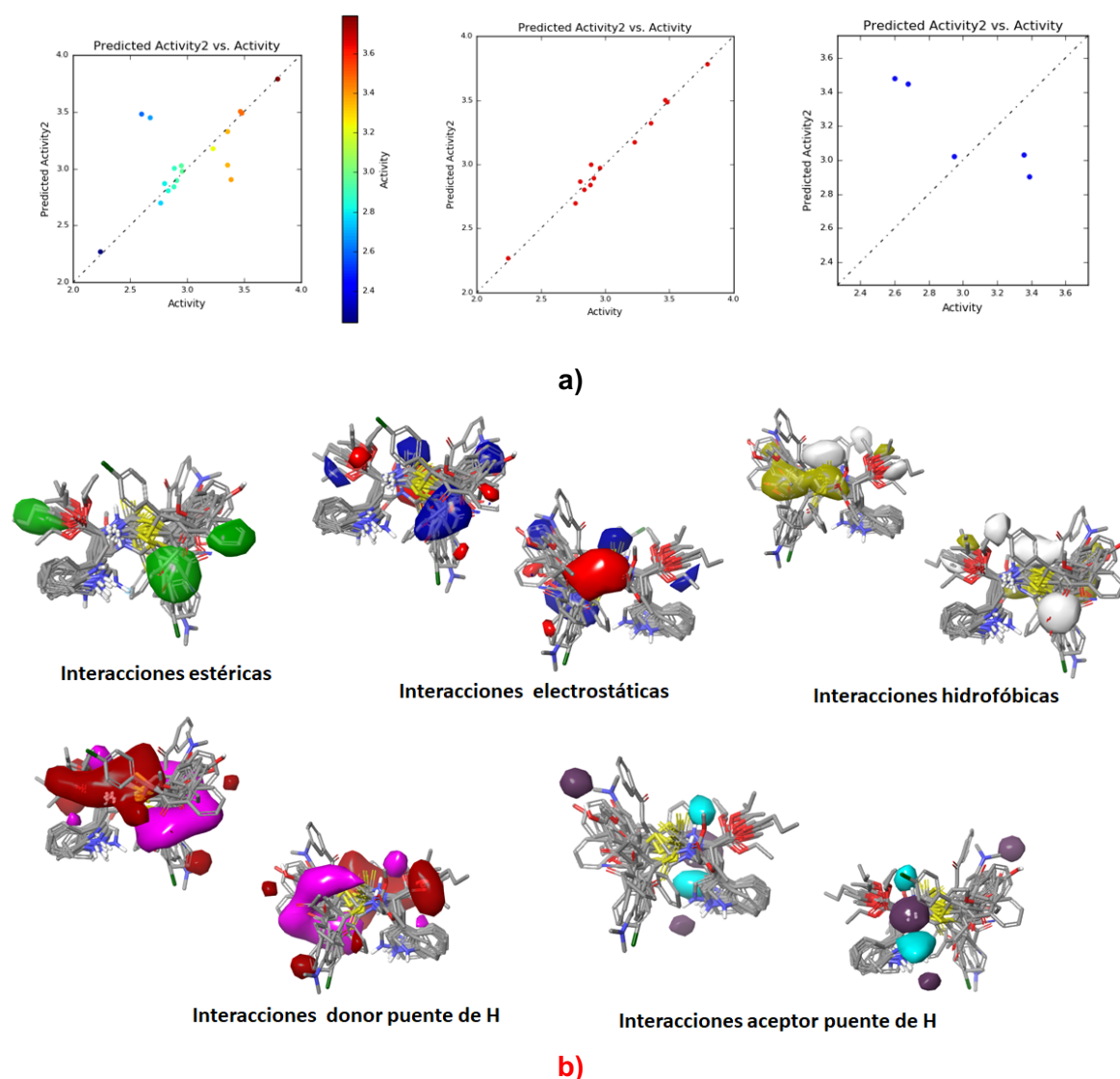


Figura 19. **a)** Regresión lineal obtenida para los compuestos DC1-18 y sus valores de IC<sub>50</sub> medidos y predichos por el método QSAR GAUSSIAN. **b)** Diagramas de contorno obtenidos para el alineamiento de las estructuras DC1-18

Posteriormente, el método QSAR FORCE FIELD fue usado con un set de entrenamiento del 70% y un set de prueba del 30% con alineamiento flexible de los ligandos DC1-DC10. Este método se caracteriza por usar un algoritmo que relaciona los valores de actividad conocidos y las características 3D de un conjunto de compuestos alineados (similar a CoMFA/ CoMSIA). Permite visualizar el modelo QSAR en el espacio de químico de trabajo para evaluar cualitativamente, estableciendo dónde agregar o eliminar grupos funcionales, y usar el modelo para predecir cuantitativamente las actividades de otras moléculas. Además, puede crear un diagrama de dispersión de actividades conocidas y predichas para evaluar el modelo. Los potenciales estéricos de Lennard-Jones se toman del campo de fuerza OPLS\_2005, al igual que las cargas atómicas de los campos electrostáticos. Los campos hidrófobos se basan en los tipos de átomos y los parámetros hidrófobos del trabajo de Ghose y colaboradores (Kwan et al., 2010). Los campos de aceptores y donores de puente de hidrógeno se basan en definiciones de características de farmacóforo de fase, con puntos proyectados. Empleando este método, para dos factores se obtuvo un valor de R<sup>2</sup> scramble de 0,8591, mostrando un buen ajuste de los datos a la regresión usada, la cual se presenta en la Figura 16a.

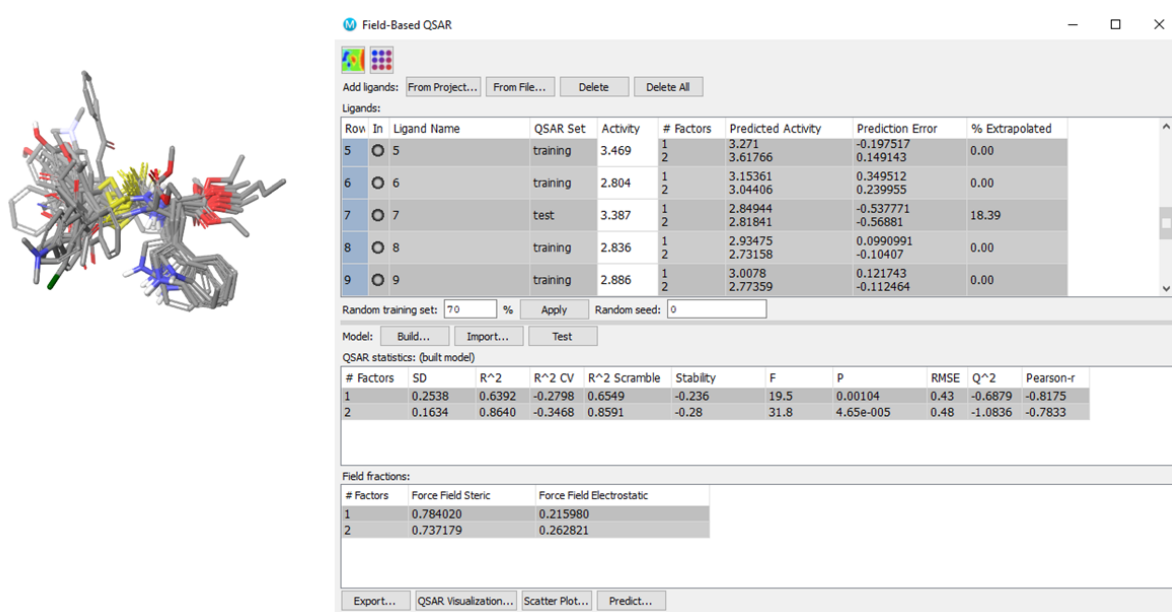
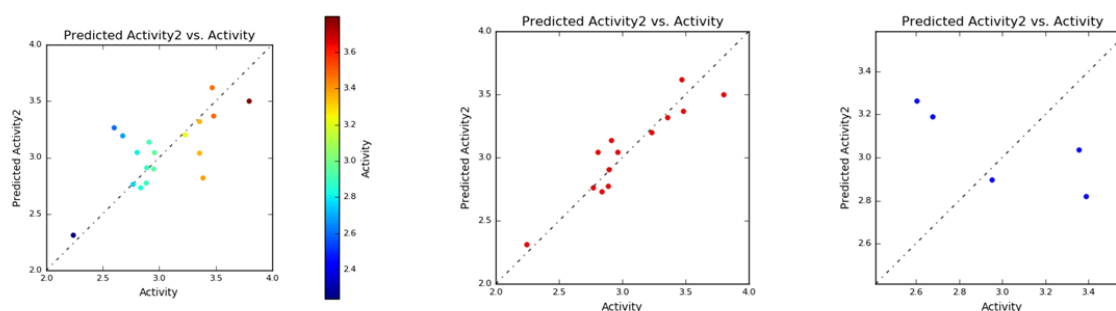
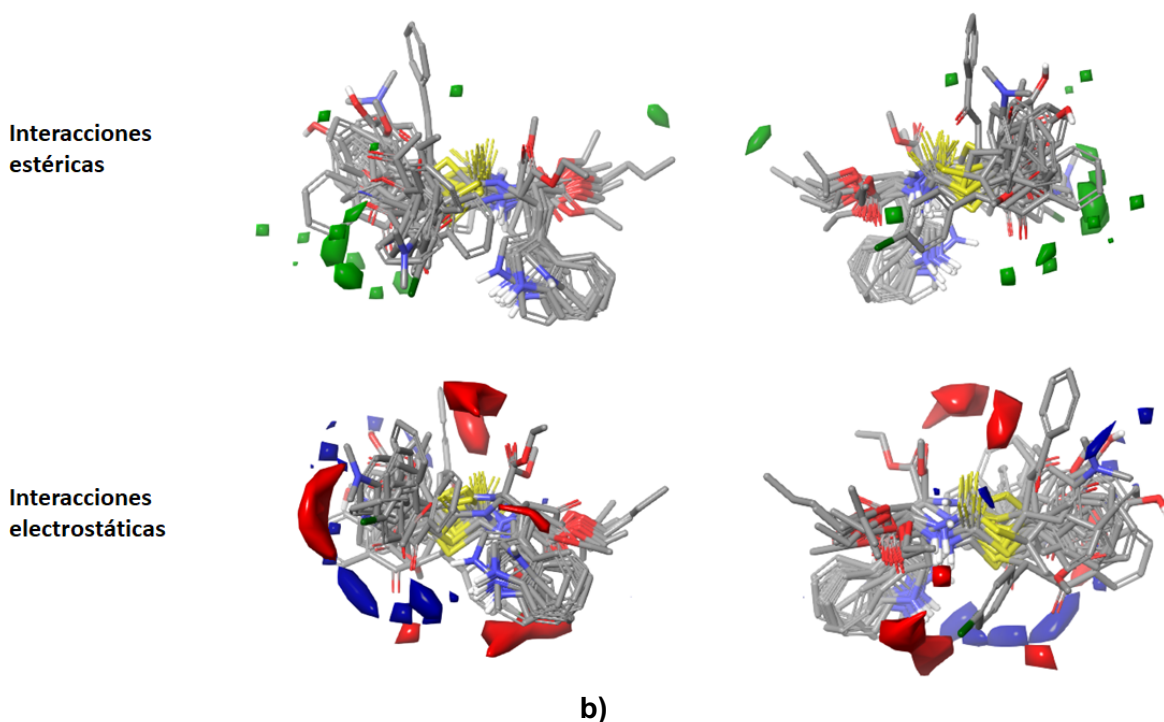


Figura 20. Parámetros y alineamiento realizado para compuestos DC1-18 para el método QSAR FORCE FIELD



a)



**Figura 21. a)** Regresión lineal obtenida para los compuestos DC1-18 y sus valores de IC50 medidos y predichos por el método QSAR FORCE FIELD. **b)** Diagramas de contorno obtenidos para el alineamiento de las estructuras DC1-18

Los diagramas de contorno obtenidos usando este método permite validar el favorable efecto del tamaño molecular ubicado en el fragmento hidrocarbonado proveniente de la vinilcetona precursora sobre la actividad antifúngica. Respecto a las interacciones electrostáticas indagadas usando esta metodología, se evidencia efecto favorable de grupos electropositivos débiles sobre el fragmento derivado de vinilcetona y de grupos electronegativos hacia el fragmento de cadena lateral proveniente del aminoácido. Finalmente, se aplicó el método ATOM BASED QSAR (Figura 19), aplicando un set de entrenamiento del 70% y de prueba del 30%. En este método, una molécula se trata como un conjunto de esferas con radios de van der Waals superpuestos, que de acuerdo con las alineaciones estructurales generadas por el modelo farmacóforo, permite el diseño y creación de modelos 3D-QSAR utilizando los métodos de análisis de campo molecular comparativo (CoMFA) y análisis de índice de similitud molecular comparativa (CoMSIA). Los modelos QSAR basados en átomos y 3D-QSAR han mostrado un buen valor de correlación entre la actividad experimental y la predicha (Choundhury, 2015) Los resultados de este análisis mostraron que Grupos hidrofóbicos o no polares en el fragmento hidrocarbonado derivado de la vinilcetona precursora, presencia de densidad electrónica en las vecindades del grupo ditiocarbamato y donores de puentes de hidrógeno favorecen la actividad antifúngica para este tipo de ditiocarbamatos de alquilo, además de los evidenciables efectos estéricos previamente discutidos.

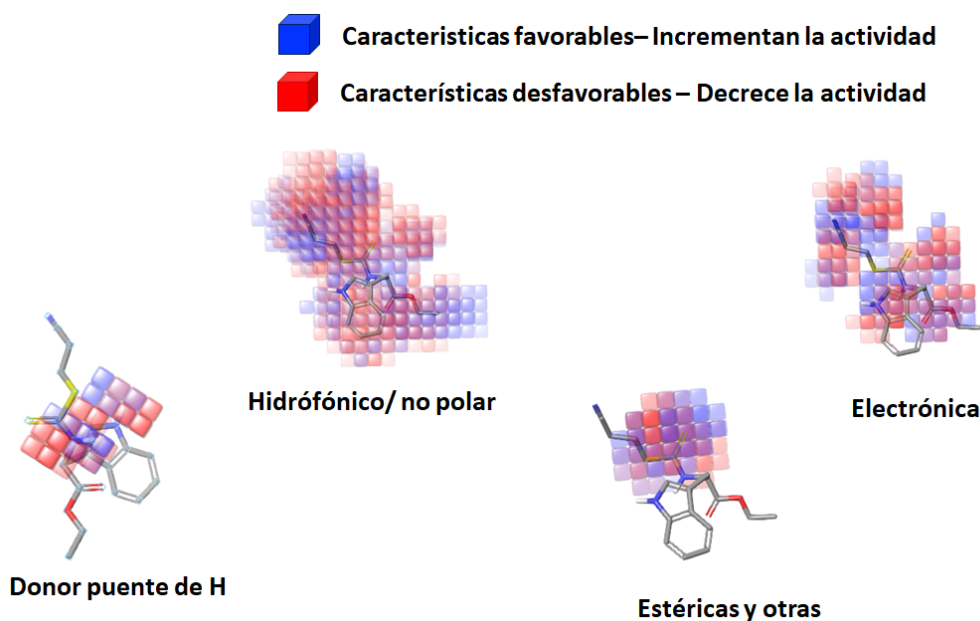


Figura 22. Diagramas de contorno obtenidos para los DC1-18 usando el método ATOM-BASED QSAR

Los resultados obtenidos para las pruebas de invernadero son presentados como Box Plot. La notación T0 corresponde a la medida realizada una semana antes de cualquier aplicación, como medida inicial y de control, para todas las plantas, por lo tanto solo es un dato tomado más no evaluado estadísticamente, T1 corresponde a la medida realizada una semana después de la infección y sin la aplicación de los compuestos, T2 corresponde a dos semanas de infección y 1 semana con la aplicación del compuesto evaluado, y T3 corresponde a tres semanas después del proceso de infección y 2 semanas de la aplicación del compuesto. Las aplicaciones de los compuestos CH4, CH5, DC7 y DC9 se realizaron cada dos días, con un total de nueve aplicaciones.

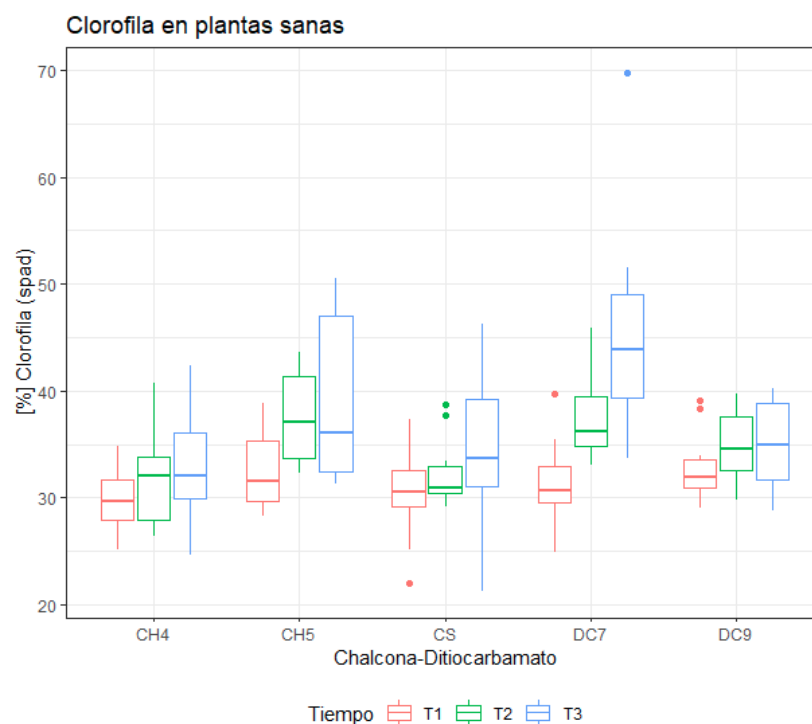
Las variables que se tuvieron en cuenta fueron: número de hojas, altura de la planta (cada n, total 10 por tratamiento) y clorofila. En total se evaluaron 11 tratamientos incluyendo los controles, y cada tratamiento tenía un n=10 para un total de 110 plantas de uchuva. Los tratamientos fueron aleatorizados, y se dividieron en 2 grupos, el primero el grupo de las plantas sanas (PS), esto quiere decir que fue un grupo que a lo largo de la evaluación fueron tratadas con los compuestos, más no infectadas y su control (CS) consistió en la planta de uchuva sin ningún compuesto; el segundo grupo se denominó en el estudio como el grupo de las plantas enfermas (PE), aquí un grupo de plantas fueron infectadas hasta presentar síntomas, y luego fueron tratadas con los compuestos para determinar la eficacia de estos mismos, para este grupo se manejaron dos controles, uno llamado control plantas enfermas (CE) el cual es la planta sin ningún compuesto pero infectada con *Fusarium oxysporum* y el otro llamado control comercial (CC), que hace relación al fungicida de uso comercial llamado Dithane M45.

La fotosíntesis es un proceso físico-químico donde un grupo de organismos como plantas y bacterias utilizan la radiación solar y la transforman en energía química para sintetizar

compuestos orgánicos, a través de sustancias inorgánicas como agua, minerales y CO<sub>2</sub>. Es considerado un proceso fundamental para la vida sobre la tierra y todos los organismos heterótrofos dependen de este proceso para su subsistencia. Es por ello que en el monitoreo de un cultivo se hace necesario la evaluación periódica del comportamiento o concentración de clorofila, así mismo como lo es el índice fotosintético, área foliar, la altura de la planta y número de hojas.

En este estudio se trabajaron con las variables: clorofila, número de hojas y altura de la planta.

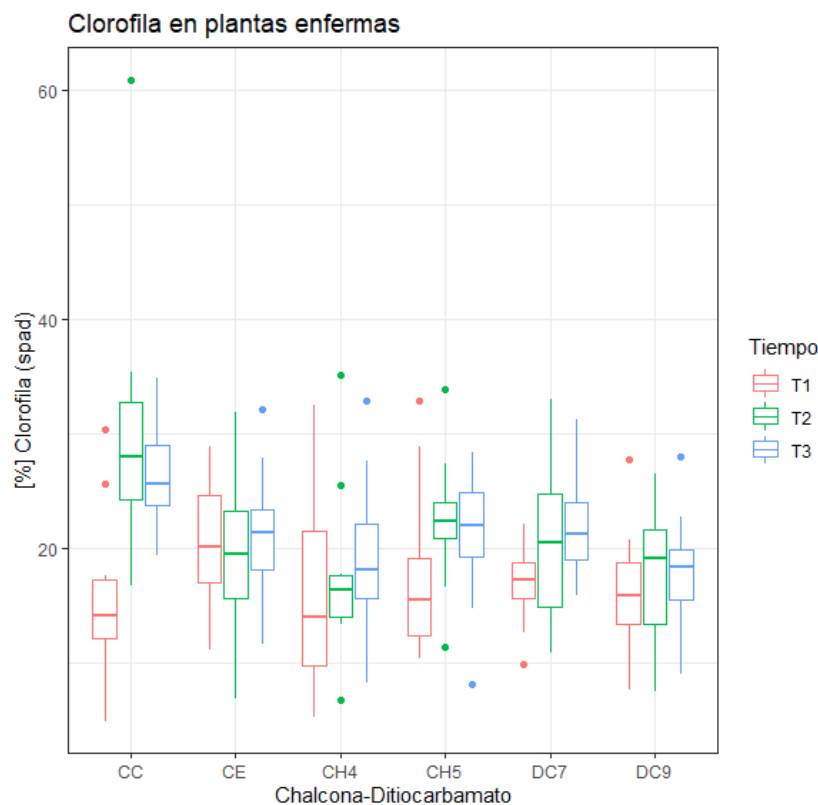
La clorofila es una molécula que se encuentra en los cloroplastos de las células vegetales, es un pigmento responsable del color verde de las plantas, algas y algunas bacterias fotosintéticas. El contenido de clorofila en las plantas, puede estar estrechamente relacionada con su nivel nutricional pero también según (Mendoza et al., 1998; Lopez-Bellido et al., 2004; Moreno et al., 2008) el contenido de clorofila en las plantas puede estar relacionado con el índice de fotosíntesis, por lo que considerablemente influye en el rendimiento de una planta tanto en su desarrollo como en el rendimiento final de la cosecha (Tolentino et al., 2016). Por lo tanto en este estudio esta variable es importante debido a que da una estimación del comportamiento y estado de la planta, esta medición se realizó con el medidor minolta Spad. Así mismo la altura y el número de hojas son características fisiológicas de gran importancia en el crecimiento y desarrollo de la planta, estas mismas pueden ser relacionadas con el estado de la planta y su comportamiento en relación a condiciones ambientales o presencia de otros microorganismos benéficos o no benéficos.



Gráfica 2. Box Plot de la clorofila medida durante T1 a T3 en plantas tratadas con los compuestos CH4, CH5, DC7 y DC8

La gráfica 2 permite evidenciar que el efecto de los compuestos es positivo durante su tratamiento. Este grupo en particular de plantas no fueron infectadas, sin embargo, se le realizó la aplicación al igual que a las plantas enfermas para poder verificar parámetro de

fitotoxicidad. El control usado (dithane) mostró un comportamiento ascendente, es decir la concentración de clorofila aumento a lo largo del tiempo y por lo tanto el crecimiento y desarrollo de la plata era óptimo o normal, al igual que con los diferentes compuestos evaluados.

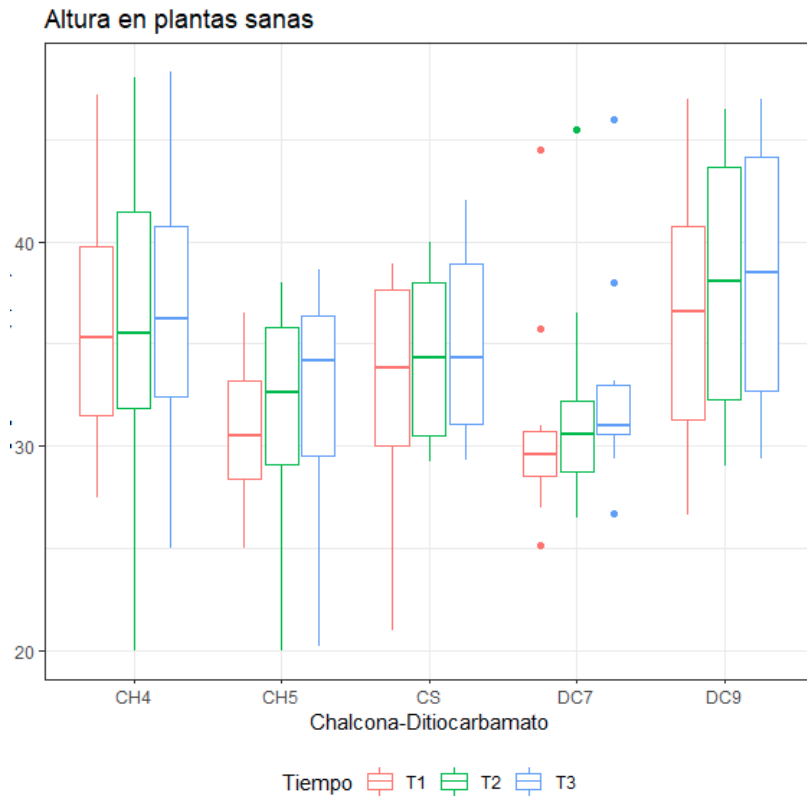


Gráfica 3. Box Plot de la clorofila medida durante T1 a T3 en plantas enfermas tratadas con los compuestos CH4, CH5, DC7 y DC8

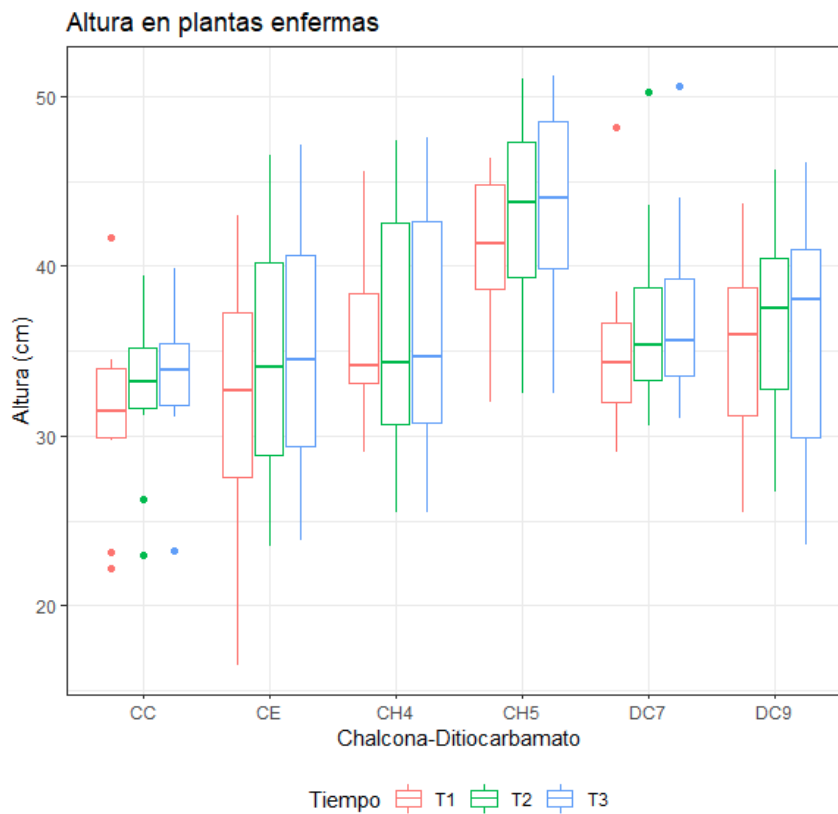
Aparentemente los compuestos no tienen efectos negativos para el desarrollo óptimo de la planta de uchuva. Sin embargo, uno de los compuestos que muestra notablemente los cambios esperados es DC7. El valor máximo de clorofila medida para este grupo de plantas fue 62. Los resultados obtenidos (Gráfica 3) permiten establecer que no hay diferencias significativas a lo largo del tiempo entre los diferentes compuestos tanto para CH4 y CH5 como para DC7 y DC9, pese a que dentro de las diferencias no significativas se encuentran varios datos atípicos, correspondiendo al reflejo de un n experimental de 10 por compuesto.

Por lo tanto, estas diferencias atípicas hacen parte del método de aleatorización y capacidad de desarrollo y resistencia de cada organismo. Por otro lado, el control dithane, que es un fungicida comercial de amplio espectro, y que fue utilizado como herramienta para comparar diferencias entre los compuestos, tiene la capacidad de generar beneficio a la planta enferma permitiendo que la clorofila ascienda y por lo tanto mostrando su efecto controlador, permitiendo que pueda continuar con su desarrollo. Sin embargo, es relevante mencionar que, para efectos prácticos, este agroquímico tiene efectos negativos potenciales para la salud.



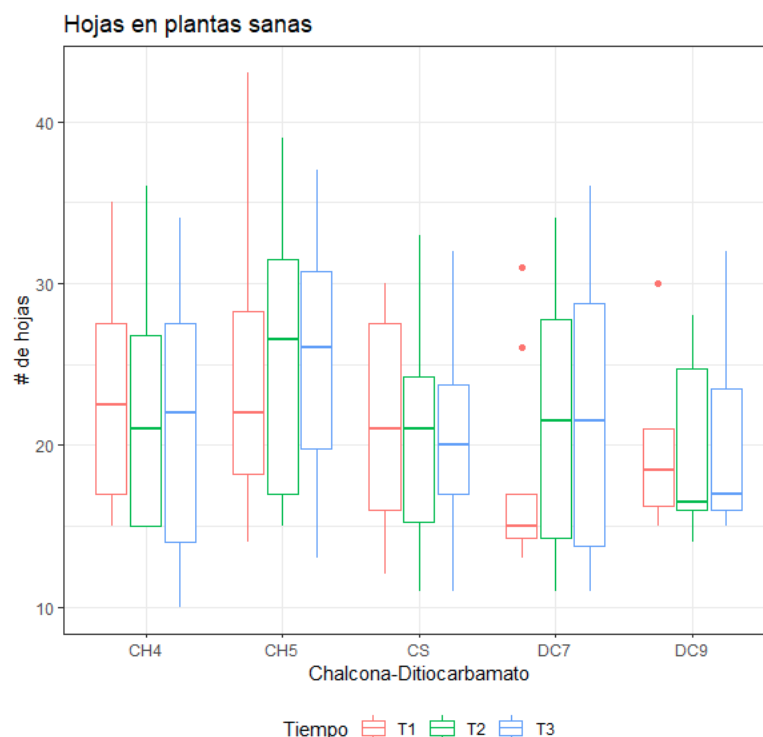


**Gráfica 4.** Box Plot de la altura medida durante T1 a T3 en plantas sanas tratadas con los compuestos CH4, CH5, DC7 y DC8

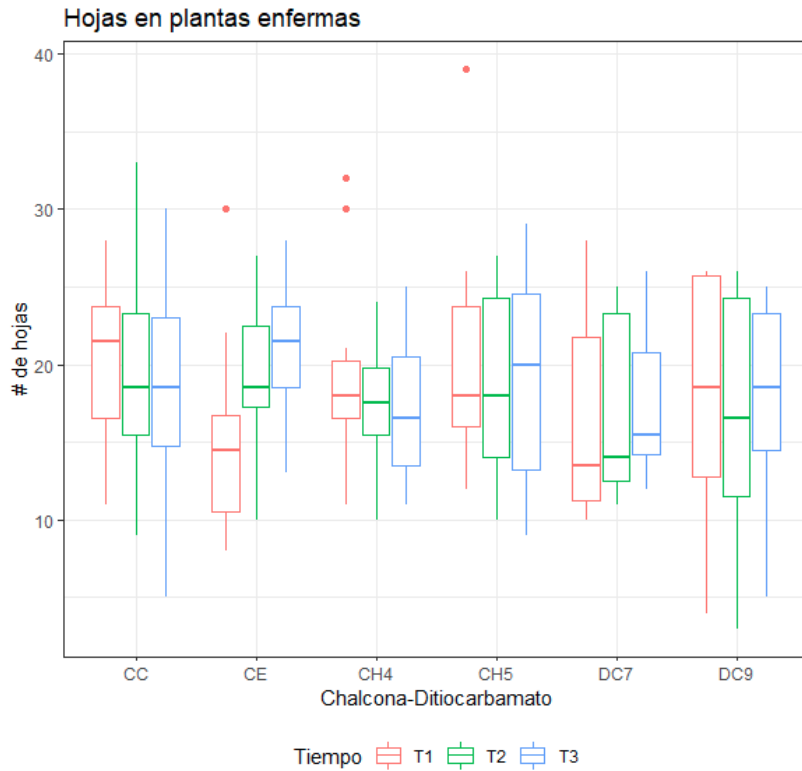


**Gráfica 5.** Box Plot de la altura medida durante T1 a T3 en plantas enfermas tratadas con los compuestos CH4, CH5, DC7 y DC8

Una de las variables estudiadas durante el experimento de invernadero fue la altura de la planta. Se considera que, al ser invadida una planta con un hongo fitopatógeno, su desarrollo no va a ser el mismo de tal forma que esta característica decrece hasta que la planta muere. Por lo tanto, esta característica fue establecida como una de las variables de estudio. Para el grupo de plantas sin infección y solo con las aplicaciones de los compuestos, el crecimiento fue normal (Gráfica 4). Esto se establece dado que no hubo diferencias significativas en los datos obtenidos, es decir los compuestos aparentemente no tienen un efecto negativo ni generan una respuesta negativa frente al crecimiento de la planta. Por el contrario, tienen un comportamiento esperado, el cual corresponde al aumento en medidas durante el experimento en función del tiempo. Los datos atípicos encontrados pueden deberse a algún efecto de la aleatorización, y al desarrollo del organismo, su capacidad de absorción y fotosíntesis, absorción de agua, entre otros factores que pueden beneficiar o afectar el desarrollo de la planta, los cuales fueron muy difíciles de controlar dadas las condiciones del experimento. Para las plantas infectadas (Gráfica 5), las cuales fueron tratadas con los compuestos CH4, CH5, DC7 y DC9, se puede ver que el crecimiento de la planta es directamente proporcional a lo largo del tiempo, situación que puede estar correlacionada con un efecto positivo de los compuestos, que posiblemente contrarrestan el efecto negativo del hongo permitiéndole a la planta que se siga desarrollando.



Gráfica 6. Box Plot del número de hojas medido durante T0 a T3 en plantas sanas tratadas con los compuestos CH4, CH5, DC7 y DC8



Gráfica 7. Box Plot de la altura medida durante T0 a T3 en plantas enfermas tratadas con los compuestos CH4, CH5, DC7 y DC8

Por la naturaleza del estudio, el método de recolección de información que se usó fue el de observación y conteo, por lo tanto el análisis y presentación de datos es de tipo descriptivo - numérico, del cual se establecieron variables que fueran posibles de manejar en condiciones de invernadero como la altura, clorofila, y por ultimo el numero de hojas. Según (Sanchez, 2002) el número de hojas varía de acuerdo con la edad de la planta, sin embargo en el transcurso del tiempo de observación las diferencias no fueron significativas, y por lo tanto evaluar el número de hojas en este método no genera ningún impacto con relación al uso de los compuestos, pues, la planta presenta los cambios comunes en la fisiología de esta misma, crecimiento de hojas apicales, pérdida de primeras hojas, y algunas otras causadas por el roce al hacer las medidas, es decir pérdida de forma mecánica.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	P-val(>F)	
Tiempo	2	54.06	27.03	1.43	0.2578	Table 1: ANOVA - CH4
Residuos	27	511.76	18.95			
Tiempo	2	1016.78	508.39	11.27	0.0003	Table 2: ANOVA - DC7
Residuos	27	1218.46	45.13			
Tiempo	2	224.44	112.22	3.60	0.0412	Table 3: ANOVA - CH5
Residuos	27	842.17	31.19			
Tiempo	2	28.36	14.18	1.05	0.3653	Table 4: ANOVA - DC9
Residuos	27	366.20	13.56			

Tabla 3. Análisis de varianza para cada uno de los compuestos y precursores.

Uno de los propósitos en el proyecto alternos a los objetivos planteados era poder evaluar y determinar que los compuestos no son fitotóxicos, analizándolo desde una variable en específica como lo es la clorofila, por lo tanto se buscó evaluar que a lo largo del tiempo los niveles de clorofila no disminuyan, esto en el grupo de plantas sanas (PS). Entonces:

$$H_0 : \mu_1 \leq \mu_2 \leq \mu_3$$

Para cada uno de los tratamientos en el grupo de PS, el promedio de clorofila a lo menos, se mantiene en cada uno de los tiempos. De esta manera, se construyó un análisis de varianza para evaluar cada una de estas hipótesis en cada tratamiento, comprobando los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza con el qq-plot y el test de *Levene* respectivamente.

Se analizó más detenidamente las diferencias, viendo que las diferencias se dan únicamente cuando aumenta el nivel de clorofila a medida que pasa el tiempo (esto se puede ver tanto en comparaciones múltiples del promedio, como viendo directamente en las gráficas 2 y 3, lo cual confirma la hipótesis en todos los casos.

De esta manera, desde la estadística se puede afirmar que los niveles de clorofila no decrecen a medida que avanza el tiempo para ninguno de los tratamientos y por lo tanto es posible decir que los compuestos no están generando un efecto o impacto negativo en las plantas, y por esto mismo podría no considerarse fitotóxicos, sin embargo es necesario más análisis y tomas de datos.

Por otro lado, y para cumplir con el siguiente objetivo, la idea fue evaluar los diferentes tratamientos entre ellos, evaluando si existen diferencias entre ellos y entre los diferentes momentos del tiempo. De alguna manera lo que se busca es buscar un mejor tratamiento con los datos a la mano. Así, se plantea la hipótesis estadística:

$$H_0 : \mu_{11} = \mu_{12} \dots = \mu_{it} = \dots = \mu_{53}$$

Para  $i = 1, 2, 3, 4, 5$  los 5 tratamientos y  $t = 1, 2, 3$  los 3 tiempos evaluados. Lo que se busca es rechazar esta hipótesis, asegurando que existan diferencias entre estos diferentes promedios y así entrar a buscar las diferencias entre ellos.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	P-val(>F)
Tiempo	2	690.73	345.37	7.30	0.0009
Tratamiento	5	883.15	176.63	3.73	0.0032
Tiempo:Tratamiento	10	832.23	83.22	1.76	0.0720
Residuals	162	7663.35	47.30		

**Tabla 4.** Análisis de varianza para cada uno de los compuestos y precursores, evaluación de tiempos y la interacción entre ellos.

Se observó que los p-valores asociados a tiempos y tratamientos, son significativos, y por lo tanto existe diferencia entre los tratamientos y también entre sus diferentes tiempos.

Finalmente se quiso comprobar y comparar los tratamientos, y de esta forma determinar cuál es más efectivo desde la perspectiva del aumento de clorofila a través de los diferentes tiempos, es decir se tomó esta variable como la principal determinante del comportamiento de las plantas.

Tratamiento	Aumento promedio entre T <sub>1</sub> y T <sub>3</sub>
CC	11.13*
CE	0.72
CH <sub>4</sub>	2.95
CH <sub>5</sub>	3.32
DC7	5.10
DC9	1.86

Tabla 5. Tabla de comparaciones múltiples.

En la tabla 5 es posible ver la amplia superioridad de (CC) respecto a los demás, sin embargo, el (CC) puede tener efectos adversos para la salud humana y el medio ambiente, por lo que el compuesto con mejor comportamiento seguido del (CC) sería (DC7), y a pesar de que no tiene el mismo grado de efectividad con (CC), esto podría dar paso a unas próximas evaluaciones y experimentos de DC7 para que su efecto sea mucho más óptimo.

## CONCLUSIONES

Fueron obtenidos los compuestos ditiocarbamatos con porcentajes de rendimiento entre 30-95% dada la influencia del carácter electrónico de los grupos del anillo aromático de las vinilcetonas usadas. Los resultados del efecto antifúngico de los compuestos mostraron que los precursores CH<sub>4</sub> y CH<sub>5</sub> se destacaron por tener una mayor capacidad de inhibición, así mismo los ditiocarbamatos derivados de estos (DC7 y DC9), pues el porcentaje de inhibición es alto y el IC<sub>50</sub> obtenido para estos es mínimo. La evaluación de los compuestos ditiocarbamatos fue a lo largo de 3 semanas, cada dos días y en este tiempo, se lograron datos preliminares como los datos de fitotoxicidad, en donde fue posible observar que no existe un efecto negativo visible, también, a medida que el tiempo avanzaba, se veía una mejoría en el estado de las plantas, efecto que puede ser causado por los compuestos, sin embargo al ser un estudio que tuvo interrupciones de muestreo debido al problema epidemiológico COVID-19, es recomendable aumentar la intensidad de muestreo, pues a pesar que en las gráficas 2-7, se ve el progreso de las plantas enfermas luego de la aplicación es de gran importancia reevaluar estos resultados. También el compuesto DC7 actúa de manera efectiva en el efecto antifúngico contra *Fusarium oxysporum*, sin embargo es necesario realizar más experimentos para mejor y optimizar la actividad antifúngica de este compuesto.

## OBSERVACIONES



Figura 23. **a.** estado de la planta 1 semana luego de la infección **b.** Estado de la planta sin ninguna infección.

Durante el proceso del muestreo, la toma de fotos como registro visual del proceso fue fundamental. En esta figura 20, es posible ver las diferencias de una planta totalmente sana (b) y una con deficiencias de todo tipo (a), posiblemente causadas por la infección del patógeno, a pesar de que las dos plantas tenían las mismas condiciones una es el resultado del proceso de infección por un patógeno como *Fusarium oxysporum*.

Según las gráficas 2-7, a lo largo del tiempo t1 a t3, y luego de las aplicaciones, las plantas siguen desarrollándose de manera normal, sin embargo, algunas presentaban síntomas como en este caso (Figura 20, a), de las cuales se determinó que a pesar de presentar los síntomas comunes por una infección por fusarium, el uso de los compuestos estaba generando un efecto positivo y antagonista frente al hongo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abonia, R.; Alborno, A.; Insuasty B.; Quiroga, J.; Meier, H.; Hormaza, A.; Nogueras, M.; Sánchez, A.; Cobo, J.; Low, J. (2001) Synthesis of novel 1,2,5,6-tetrahydro-4H-pyrrolo[3,2,1-ij]-quinolines via benzotriazole methodology. *Tetrahedron* .
2. Acuña, W. C., Díaz, J. L., & Yáñez, J. (2019). Diversity of fungal communities inhabiting symptomatic leaves of Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in the Ecuadorian Andes. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB*, 40(2), 77-86.
3. Acurio Vásconez, R. D. (2012). Técnicas de prevención y control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en clavel *dianthus caryophyllus* y su incidencia en la productividad (Bachelor's thesis).
4. Alzate, D. A., Afanador, L., Durango, D. L., & Garcia, C. M. (2009). Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios. *Vitae*, 16(1), 116-125.
5. Amézquita, J. E. R., Monsalve, J. V., & Rosero, S. E. V. (2010). Evaluación de Microorganismos Aislados de Gallinaza por su Potencial para el Biocontrol de *Fusarium* (*F. oxysporum*) en Plántulas de Uchuva (*Physalis peruviana*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 63(2), 5499-5509.
6. Ammann, C. (2019). Exportación de productos agropecuarios colombianos a Suiza—oportunidades y barreras (Master's thesis, Universidad EAFIT).
7. Arias, F. J., Gómez, L. M., Suarez, E., & Rendón, S. (2015). Inteligencia de mercados para la cadena de uchuva colombiana (*Physalis Peruviana*). *Revista Oidles*, 18.
8. Armstrong, G. M., GM, A., & JK, A. (1981). *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases.
9. Badii, M. H., & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena: International Journal of Good Conscience*, 1(1), 82-89.
10. Bado, S. G., Cerri, A. M., & Vilella, F. (2005). Fauna insectil asociada a cultivos de dos especies de *Physalis* (Solanaceae) en Argentina. *Bol. Sanid. Veg., Plagas*, 31, 321-333.
11. Benavides, M. A., & Mora, H. R. (2005). Los insectos-plaga limitantes en el cultivo de la uchuva y su manejo. *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva Physalis peruviana L.*, 83-96.
12. BENITEZ DE ROJAS, C., & MAGALLANES NESSI, A. (1998). El género *Physalis* (Solanaceae) de Venezuela. *Acta Botanica Venezuelica*, 11-42.
13. Bratulescu, G. (2009) A new and efficient one-pot synthesis of indoles. *Tetrahedron letters*
14. Bravo-Ruiz, G., Ruiz-Roldán, C., & Roncero, M. I. G. (2013). Lipolytic system of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(9), 1054-1067.
15. Brown, J. F., & Ogle, H. J. (1997). *Plant pathogens and plant diseases*. Published by Rockvale Publications for the Division of Botany, University of New England.
16. Browne, L. M., Conn, K. L., Ayert, W. A., & Tewari, J. P. (1991). The camalexins: New phytoalexins produced in the leaves of *camelina sativa* (cruciferae). *Tetrahedron*, 47(24), 3909–3914.
17. Burgess LW. 1981. General Ecology of the Fusaria. In: Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ, eds. *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. University Park, PA, USA: The Pennsylvania State University Press, 225 – 235.

18. Burraco, A. B. (2005). Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. Reverté.
19. Cadena, Y., & Recalde, A. (2012). Plan estratégico exportador de uchuva producida y comercializada por la Asociación Aprocam San Mateo puerres (Nariño) al mercado de Tulcan (Ecuador).
20. Cardenal, L. Y. R., & Maldonado, J. C. P. (2012). Establecimiento de un protocolo de propagación de *Physalis peruviana* L. a partir de yemas axilares adultas. *Ciencia en desarrollo*, 4(1), 71-86.
21. Cárdenas Pinzón, J. I., & Vallejo Zamudio, L. E. (2016). Agricultura y desarrollo rural en Colombia 2011-2013: una aproximación. *Apuntes del CENES*, 35(62), 87-123.
22. Carmona, S. L., Burbano-David, D., Gómez, M. R., Lopez, W., Ceballos, N., Castaño-Zapata, J., ... & Soto-Suárez, M. (2020). Characterization of Pathogenic and Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates Associated with Commercial Tomato Crops in the Andean Region of Colombia. *Pathogens*, 9(1), 70.
23. Cavallini, L. F. A. (1998). *Fitopatología: un enfoque agroecológico*. Editorial Universidad de Costa Rica.
24. Choudhury, A. D. (2015). Atom-based QSAR and 3D QSAR using pharmacophore based alignment for discovery of nimesulide-derived SKBR-3 cell line inhibitors. *Medicinal Chemistry Research*, 24(3), 999-1012.
25. Collado, D. (2014). *Química de Heterociclos. Quinolina e isoquinolina*.
26. Collazos, A. J. G., Munar, E. A. V., Ayala, F. A. V., & Velandia, K. D. G. (2019). Evaluación del comportamiento poscosecha de uchuva provenientes de sistemas de producción convencionales y agroecológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1273-1285.
27. Covarrubias, D. A. V., Belmont, R. M., Pérez, A. J., & Moctezuma, H. E. F. (2013). Aceites esenciales y extractos acuosos para el manejo in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 170-179.
28. Cruz, R., & Benamú Pino, M. A. (2015). Comparación de la edafofauna para cuatro usos de suelo. In V Congreso Latinoamericano de Agroecología-SOCLA (La Plata, 2015).
29. Daouk, R. K., Dagher, S. M., & Sattout, E. J. (1995). Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, 58(10), 1147-1149.
30. De la Rotta, M.C. 2014. Enfermedades de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). In: Carvalho CP, Moreno DA, editors. *Physalis peruviana: fruta andina para el mundo*. Spain: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo –CYTED.p.49-78.
31. De Granada, E. G., De Amezquita, M. C. O., Mendoza, G. R. B., & Zapata, H. A. V. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta biológica colombiana*, 6(1), 7-25.
32. Duan, Y., Qu, W., Chang, S., Li, C., Xu, F., Ju, M., ... Miao, H. (2020). Identification of pathogenic groups and pathogenic molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* in China. *Phytopathology*<sup>TM</sup>. doi:10.1094/phyto-09-19-0366-r
33. Dussi, M. C., & Facultad de Agronomía. (2007). Intercepción y distribución lumínica en agro-ecosistemas frutícolas. Árboles frutales. Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Argentina: Ed. Gabriel O. Sozzi. Capítulo 6, 229.
34. Edel-Hermann, V., & Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*, 109(4), 512-530.
35. ELDON, S.; HILLOCKS, R. J. 1996. The Effect of Reduced Phytoalexin Production on the Resistance of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum*) to *Verticillium* and *Fusarium* Wilts. *Annals of Applied Biology*: 129: 217- 225



36. Estupiñán Rodríguez, H., & Ossa Canencio, J. A. (2007). Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo.
37. Estupiñán Rodríguez, H., & Ossa Canencio, J. A. (2007). Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo.
38. Fischer G., Almanza P.J. 1993. La uchuva (*Physalis peruviana* L.) una alternativa promisoriosa para las zonas altas de Colombia. *Agricultura Tropical*. 30 (1), 79- 87.
39. Fischer, G. (2000). Fisiología del cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) (No. Doc. 20599)\* CO-BAC, Bogotá).
40. Fischer, G., & Melgarejo, L. M. (2014). Ecofisiología de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Physalis peruviana* L., 29.
41. Fischer, G., & Miranda, D. (2012). Uchuva:(*Physalis Peruviana* L.) (No. Doc. 26022) CO-BAC, Bogotá).
42. Fischer, G., & Orduz-Rodríguez, J. O. (2012). Ecofisiología en frutales (No. Doc. 26022) CO-BAC, Bogotá).
43. Fischer, G., Almanza-Merchán, P. J., & Miranda, D. (2014). Importância e cultivo do (*Physalis peruviana* L.) no mundo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(1), 01-15.
44. Fischer, g., Melgarejo, l., Duarte, a., Villalobos, r., Moreno, d., Gil, a., ... & Pássaro, c. (2013). *Physalis peruviana*: fruta andina para el mundo: cultivo, recurso genético, agroindustria, normativa y mercado.
45. Fischer, G., Miranda, D., Piedrahita, W., & Romero, J. (2005). Poscosecha y exportación de la uchuva en Colombia. Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva *Physalis peruviana* L. Bogota: Universidad Nacional.
46. Flórez, R., Víctor, J., Fischer, G., Sora, R., & Ángel, D. (2000). Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Editorial UN.
47. Fravel, D., Olivain, C., & Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New phytologist*, 157(3), 493-502.
48. García Muñoz, M. C. (2003). Uchuva: cosecha y postcosecha.
49. García-Camarillo, E. A., Quezada-Viay, M. Y., Moreno-Lara, J., Sánchez-Hernández, G., Moreno-Martínez, E., & Pérez-Reyes, M. C. J. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera [*Carya illinoensis* (FA Wangenh) K. Koch]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 8-12.
50. Garrett SD. 1970. Pathogenic root-infection fungi. London, UK: Cambridge University Press.
51. Gil, H., & Milena, R. (2009). Importancia socioeconómica del sector frutícola en Colombia.
52. Góngora Salgado, A. C., & Rojas Gracia, P. (2006). Incidencia de las enfermedades en uchuva *physalis peruviana* L., por estado fenológico y de acuerdo con la ubicación en los diferentes estratos de la planta, en el departamento de Cundinamarca.
53. Gordon, T. R., & Martyn, R. D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual review of phytopathology*, 35(1), 111-128.
54. Grundy, P., & Short, S. (2003). Potential alternative to chickpeas for trap cropping. ANP Technology. Green mount Press. DPI, Queensland, 22, 1.
55. Guadet, J. , Julien, J. , Lafay, JF y Brygoo, Y. ( 1989 ) Filogenia de algunas especies de *Fusarium* , según lo determinado por la comparación de secuencias de ARN ribosómico

- de subunidad grande . Mol. Biol. Evol . 6 , 227 - 242 .
56. Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., & Olivar, R. (2008). Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia*, 7(13), 50-74.
  57. Guerrero, J. A., & Velandia, Y. (2013). Evaluación de metodologías para el análisis de productos tóxicos de la degradación de fungicidas ditiocarbamatos. *Revista Colombiana de Química*, 42(3), 17-22.
  58. Heath, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current opinion in plant biology*, 3(4), 315-319.
  59. Hormaza, A.; Hineschiedts, M. (2004). Gekreuzt konjugierte oligomere aus pyrrol-, benzol-und carbonyl bausteinen. *Tetrahedron*.
  60. Hür, D.; y Gûven, A. (2002) The acidities of some indoles. *Journal of molecular structure (Teochem)*.
  61. Iannacone, J. (2020). Toxicidad de los aceites esenciales de *Bursera graveolens*, *Lepechinia meyenii* y *Myrtus communis* sobre *Chrysoperla asoralis*, *Chrysoperla externa* y *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae).
  62. ICA, Instituto Colombiano Agropecuario. (2016). Manejo fitosanitario del cultivo de la uchuva para temporada invernal. Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)
  63. ICA, Instituto Colombiano Agropecuario. (2020). Registros plaguicidas registrados- Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)
  64. Idrovo, A. J. (2000). Vigilancia de las intoxicaciones con plaguicidas en Colombia. *Revista de Salud Pública*, 2(1), 36-46.
  65. Insuasty-Obando, B. (2016). Las chalconas y su uso como precursores en la síntesis de compuestos heterocíclicos nitrogenados. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(155), 234-243.
  66. Isidró, M. P., Allaert, K., Isla, L. H., Suárez, N., García, S. T., Navarro, C. P., & García, M. R. (2003). Determinación de la actividad alelopática de extractos vegetales sobre algunos hongos fitopatógenos del suelo. *Centro Agrícola*, 30(1), 64-69.
  67. Jahangir, M., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2009). Health-affecting compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 31-43.
  68. Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.
  69. Jurado Salguero, J. F., & Villanueva Lombana, L. F. (2018). Guía práctica para la exportación de uchuva (fruta fresca) hacia Canadá, en el marco del TLC con Colombia.
  70. Kraft, J. M., & Pfleger, F. L. (2001). *Compendium of pea diseases and pests* (No. Ed. 2). American Phytopathological Society (APS Press).
  71. Kwan, D. H., Constantinescu, I., Chapanian, R., Higgins, M. A., Kötzer, M. P., Samain, E., ... & Withers, S. G. (2015). Toward efficient enzymes for the generation of universal blood through structure-guided directed evolution. *Journal of the American Chemical Society*, 137(17), 5695-5705.
  72. Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The fusarium laboratory manual*. 2006. Ames, Iowa: Blackwell Publishing CrossRef Google Scholar, 388.
  73. Ligarreto, G., Lobo, Mario., & Correa, Alejandra. (2005). Recursos genéticos del género *Physalis* en Colombia. *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva*, 9-27.
  74. Ligarreto, G.; Lobo, M.; Correa, Y.A. 2005. Recursos genéticos del género *Physalis* en Colombia. In: Fischer, G.; Miranda, D.; Piedrahita, W. y Romero, J. (Ed.). *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (Physalis peruviana L.) en Colombia*, Unibiblos, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 9-27 pp
  75. López Cruz, J. (2017). Análisis de la señalización mediada por la pared celular y el estrés oxidativo en la interacción planta-patógeno.

76. López-Díaz, C. (2019). Mecanismos genéticos y moleculares implicados en la plasticidad genómica de *Fusarium oxysporum*.
77. Lozano-Aponte, J., & Scior, T. (2012). ¿ Qué sabe Ud. acerca de... QSAR?. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(2), 82-84.
78. Mateos, R. G., & Leal, R. P. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 9(1), 5-10.
79. Mejía, M. X. L., & Infante, A. L. (2019). Investigación Acción Participativa en la cadena productiva de la Uchuva (*Physalis peruviana*), basada en estándares comerciales y ambientales internacionales. *Revista Interdisciplinaria de Estudios Latinoamericanos-RIEL ISSN: 2448-8046*, 3(1), 81-100.
80. Mendgen, K., Hahn, M., & Deising, H. (1996). Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, 34(1), 367-386.
81. Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 10(3), 311-324.
82. Montes Valencia, N. (2009) Síntesis de derivados indólicos y estudio de los índices locales de reactividad Fukui (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia)..
83. Mora-Aguilar, R., Peña-Lomelí, A., López-Gaytán, E., Ayala-Hernández, J. J., & Ponce-Aguirre, D. (2006). Agrofenología de *Physalis peruviana* L. en invernadero y fertirriego. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(1), 57-63.
84. Moreno Velandia, C. A. (2017). Interactions between *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006, *Fusarium oxysporum* Map5 and Cape gooseberry (*Physalis peruviana*). Escuela de Posgrados.
85. Mosquera, C. (2002). Polinización entomófila de la uvilla (*Physalis peruviana* L.). *Revista de Ciencias Agrícolas*, 19(1 y 2).
86. Muller, K., & Borger, H. 1940. Experimentelle Untersuchungen fiber die Phytophthora-Resistenz der Kartoffel. *Arb. biol. Abt.(Anst.-Reichsanst.)*. Bed, 23, 189-231.
87. National Research Council. 1989. Lost crops of the Incas. National Academy Press, Washington, D.C. pp. 241-251
88. Navarro Velasco, G. Y. (2013). Identificación de nuevos componentes de la ruta TOR de *Fusarium oxysporum* y determinación de su papel en la patogénesis.
89. Nene, Y. L., Reddy, M. V., Haware, M. P., Ghanekar, A. M., Amin, K. S., Pande, S., & Sharma, M. (2012). Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. *Information Bulletin No. 28 (revised)*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
90. Neto, J. R. C., Boscaini, R., & da Costa, I. F. D. (2020). sensibilidade de *Aspergillus* sp. E *Fusarium* sp. A diferentes concentrações de fungicidas. *agri-environmental sciences*, 6, 15-15.
91. Ngowi, A. V. F., Mbise, T. J., Ijani, A. S. M., London, L., & Ajayi, O. C. (2007). Pesticides use by smallholder farmers in vegetable production in Northern Tanzania. *Crop Protection (Guildford, Surrey)*, 26(11), 1617.
92. Nogués, S., Cotxarrera, L., Alegre, L., & Trillas, M. I. (2002). Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytologist*, 461-470.
93. Obrezanova, O., & Segall, M. D. (2010). Gaussian processes for classification: QSAR modeling of ADMET and target activity. *Journal of chemical information and modeling*, 50(6), 1053-1061.
94. Olivain, C., & Alabouvette, C. (1997). Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *The New Phytologist*, 137(3), 481-494.
95. Ordeñana, K. M. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Revista Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica*, 63, 22-32.

96. Osorio Aristizábal, T. (2016). Estado del arte: frutos promisorios colombianos.
97. Pedras, M. S. C., & Abdoli, A. (2013). Metabolism of the phytoalexins camalexins, their biososteres and analogues in the plant pathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(15), 4541-4549.
98. Pedras, M. S. C., & Abdoli, A. (2017). Pathogen inactivation of cruciferous phytoalexins: detoxification reactions, enzymes and inhibitors. *RSC advances*, 7(38), 23633-23646.
99. Pedras, M. S. C., & Minic, Z. (2014). The phytoalexins brassilexin and camalexin inhibit cyclobrassinin hydrolase, a unique enzyme from the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22(1), 459-467.
100. Perfetti, J. J., & Cortés, S. (2013). La agricultura y el desarrollo de los territorios rurales. Políticas para el desarrollo de la agricultura en Colombia. Bogotá: Sociedad de Agricultores Colombianos SAC-Fedesarrollo, La Imprenta Editores.
101. Pietro, A. D., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. I. G. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular plant pathology*, 4(5), 315-325.
102. Ploetz, R. C. (2015). Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Protection*, 73, 7-15.
103. Puente LA., Pinto CA., Castro ES., Cortés M. 2011. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*. 44, 1733-1740.
104. Puente, L. A., Pinto-Muñoz, C. A., Castro, E. S., & Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*, 44(7), 1733-1740.
105. Puhalla, J. E. (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, 63(2), 179-183.
106. Ramírez Castaño, G. (1999). Agricultura orgánica: insecticidas, fungicidas biológicos control biológico abonos y caldos microbiológicos (No. Doc. 24186) CO-BAC, Bogotá).
107. Ramírez Vargas, E. (2014). Evaluación de los niveles de actividad y transcripcionales in vivo de algunas enzimas hidrolíticas secretadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en su interacción con el clavel *dianthus caryophyllus* L (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
108. RAMOS SEGURA, B. J. (2019). Efecto de la concentración del aceite esencial de *Ocimum basilicum* sobre el crecimiento de *Fusarium* sp, in vitro.
109. REICHLING, J. 1999. Plant-microbe interactions and secondary metabolites with antiviral, antibacterial and antifungal properties. In: *Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology*. Wink, M. (ed). Sheffield Academy Press. USA.
110. Reol, E. M. (2003). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Revista Ecosistemas*, 12(1).
111. Roy, A., Jayaprakash, A., Rajeswary T, R., Annamalai, A., & Lakshmi, P. T. V. (2020). Genome-wide annotation, comparison and functional genomics of carbohydrate-active enzymes in legumes infecting *Fusarium oxysporum* formae speciales. *Mycology*, 1-15.
112. Ruiz Nájera, r. e., Ruiz Nájera, j. a., Guzmán Gonzalez, s., Pérez Luna, e. D. J. (2011). Manejo y control de plagas del cultivo de tomate en Cintalapa, Chiapas, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(2), 129-137.
113. Rundel, P. W., Smith, A. P., & Meinzer, F. C. (Eds.). (1994). *Tropical alpine environments: plant form and function*. Cambridge University Press.
114. Salazar MR., Chaves B., Cooman A., Jones JW. 2006. Simple phenological and

- potential production model for cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Acta Horticulturae*. 718, 105-111.
115. Salazar MR., Jones JW., Chaves B., Cooman A., Fischer G. 2008. Base temperature and simulation model for nodes appearance in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 30 (4), 862-867.
  116. Sánchez, S Juan, P. (2002). Estudios fenológicos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en El Zamorano (Bachelor's thesis, Zamorano: Escuela Agrícola Panmamericana, 2014.).
  117. Sandoval-Chávez, R. A., Martínez-Peniche, R. Á., Hernández-Iturriaga, M., Fernández-Escartín, E., Arvizu-Medrano, S., & Soto-Muñoz, L. (2011). Control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón (*Capsicum annum* L.) en poscosecha. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(2), 161-172.
  118. Silva-Tamayo, L. A. (2006). Diagnóstico de la problemática actual de enfermedades en el cultivo de uchuva *Physalis peruviana* L. en el departamento de Antioquia. (Tesis de pregrado). Recuperado de <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis240.pdf>
  119. SILVA, A. F. D. (2014). Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades biológicas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.
  120. Smith, A. (2012). Reconocimiento de las enfermedades y plagas en el cultivo de uchuva. *Avances en el manejo y control de Fusarium oxysporum en el cultivo de uchuva*.
  121. Soledade C. Pedras, Zoran Minic, (2014). the phytoalexins brassilexin and camalexin inhibit cyclobrassinin hydrolase, a unique enzyme from the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Boorganic y Medicinal Chemistry*, 22: 459-467
  122. Soto, J. C. S., & Carrascal, C. E. L. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, 16(2), 101-113.
  123. Steinberg, C., Lecomte, C., Alabouvette, C., y Edel-Hermann, V. (2016). Interacciones de raíz con *Fusarium oxysporum* no patógeno. En *Estrategias de defensa subterránea en plantas* (pp. 281-299). Springer, Cham.
  124. Summy, K. R., & French, J. V. (1988). Biological control of agricultural pests: concepts every producer should understand. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society (USA)*.
  125. Talero Urrego, C. A., Castañeda Saza, P. C., Vargas Rodríguez, G. C., Garzón Aya, A. O., Solarte Cabrera, V. M., Fuentes Rodríguez, J. A., & Méndez, L. A. (2014). Efecto de la polinización inducida con abejas *apis mellifera* en cultivos frutales con potencial exportador. Fortalecimiento del vínculo de cooperación entre la cadena productiva de las abejas y la apicultura y la cadena de los frutales mediante la construcción de un modelo de servicios ecosistémicos, a partir de la polinización en cultivos comerciales con potencial exportador de uchuva (*physalis peruviana*), mora (*rubus glaucus*) y tomate (*solanum lycopersicum*) en Cundinamarca. Publicación completa disponible en: <http://repositorio.colciencias.gov.co:80/handle/11146/21837>
  126. Tejada, L. O. (1982). *Apuntes de control biológico*.
  127. Torres Díaz, L. D. (2010). Detección de fitoalexinas en plantas de fríjol (*phaseolus vulgaris*) en respuesta a inoculación con aislamientos de actinomicetos.
  128. Torres, G. A. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía colombiana*, 17(1-3), 11-16.
  129. Torres, W. F. & Cuéllar, J. G. (2019). Diagnóstico de la problemática actual de enfermedades y plagas observadas en el cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.) en dos unidades productivas del municipio de San José de Isnos del departamento del Huila.. Recuperado de: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/28038>.
  130. Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016).

- Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39
131. Vélez, J. E., & Álvarez, J. G. (2012). Riego en frutales (No. Doc. 26022) CO-BAC, Bogotá).
  132. Verheij, E. W. M., & Coronel, R. E. (1991). Edible fruits and nuts. 2: 64 In: Faridah Hanum, I. & LJG van der Maesen, eds. *Plant Resources of South-East Asia (PROSEA)*, 2, 64.
  133. Verhoeven, G. (1991). *Physalis peruviana* L. *Plant resources of South-East Asia*. Pudoc, Wageningen, Holanda, 254-256.
  134. Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205.
  135. Villarreal, A., Aguirre, W., & Hoyos, L. (2014). Fenómeno de la niña: impacto en la producción de uchuva en Cundinamarca, Colombia. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 31(1), 118-127.
  136. Windels, C. E., & Wiersma, J. V. (1992). Incidence of *Bipolaris* and *Fusarium* on subcrown internodes of spring barley and wheat grown in continuous conservation tillage. *Phytopathology*, 82(6), 699-705.
  137. Zapata Gómez, W. (2006). Plan de mercadeo para la comercialización de uchuva fresca en Alemania. CI Andina Exotic Ltda.
  138. Zapata Pareja, J. L., Saldarriaga Cardona, A., Londoño Bonilla, M., & Díaz Diez, C. A. (2002). Manejo del cultivo de la uchuva en Colombia.