



Facultad De Ciencias
Agrarias
Universidad Nacional De
Cuyo



Tesis
LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

“USO DE EXTRACTOS VEGETALES ACUOSOS COMO
ESTRATEGIA ALTERNATIVA PARA EL CONTROL
POSCOSECHA DE *MONILINIA FRUCTICOLA*, AGENTE
RESPONSABLE DE LA PODREDUMBRE MORENA DE LOS
FRUTALES DE CAROZO”

Tesista:

Carolina Silvia Monardez

Mendoza- Argentina
2014

**“USO DE EXTRACTOS VEGETALES ACUOSOS COMO
ESTRATEGIA ALTERNATIVA PARA EL CONTROL
POSCOSECHA DE *MONILINIA FRUCTICOLA*, AGENTE
RESPONSABLE DE LA PODREDUMBRE MORENA DE LOS
FRUTALES DE CAROZO”**

Carolina Silvia Monardez
E-mail: carosil32@yahoo.com.ar

Director:
Dr. Ing. Agr. Pablo H. Pizzuolo

Co-Directora:
Dra. Ing. Agr. Gabriela S. Lucero

Tribunal evaluador:

Presidente: Msc. Ing. Agr. Sergio Juan Castellanos

Vocales: Ing. Agr. Lidia Podestá
Lic. en Brom. Claudia Amadio

Suplente: Lic. en Brom. Adriana Tarquini

RESUMEN

La podredumbre morena de los frutales de carozo causada por *Monilinia* spp. es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial, tanto en cultivo como poscosecha. Para su control se emplean habitualmente fungicidas de síntesis. La tendencia mundial a exigir alimentos de óptima calidad que no perjudiquen a la salud ni al ambiente ha llevado a tratar de disminuir el empleo de este tipo de sustancias. El uso de productos naturales, no nocivos para el ser humano y obtenidos por metodologías sencillas podría representar una alternativa de manejo fitosanitario de los cultivos válida. Los extractos vegetales han sido reconocidos como agentes antimicrobianos desde la antigüedad y recientemente han atraído el interés científico. Éstos presentan una importante producción de metabolitos secundarios, que eventualmente podrían poseer efecto fungitóxico. El objetivo de la presente tesis, es por ello, estudiar la bioactividad de los extractos vegetales de distintas especies de la flora autóctona o presente desde antaño (chañar, jarilla, pájaro bobo, retortuño y aguaribay) hacia *Monilinia fructicola*, responsable de las principales pérdidas en cultivo y poscosecha de frutales de carozo. Para ello se determinó el efecto de los extractos sobre la germinación de conidios y el crecimiento micelial de *M. fructicola*. La actividad sobre la germinación fue determinada agregando concentraciones crecientes del extracto a una suspensión de conidios de *Monilinia fructicola*. Luego se observó su efecto al microscopio óptico. La actividad sobre el crecimiento micelial fue determinada por medio de la técnica de terreno envenenado y por el efecto de los compuestos volátiles del extracto a diferentes concentraciones. Todos los extractos estudiados presentaron en menor o mayor medida un efecto inhibitorio sobre la germinación y el crecimiento de tubo germinativo de conidios de *M. fructicola*. El extracto de jarilla (*Larrea divaricata*) fue el más efectivo a las concentraciones estudiadas registrándose un efecto dosis-dependiente. En los ensayos de crecimiento micelial se observó que a bajas concentraciones de extracto de jarilla, este se vio estimulado, mientras que a concentraciones elevadas del extracto se registró inhibición del crecimiento micelial del hongo. Por todo lo mencionado anteriormente, podría decirse que el extracto de jarilla permite inhibir al hongo *M. fructicola in vitro*.

Palabras claves: frutales de carozo, poscosecha, podredumbre, extractos vegetales, biofungicida, *Monilinia fructicola*.

A mi gran amor, mi hija,
ANABELLA

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres por todo el esfuerzo que han realizado a lo largo de gran parte de mi carrera, por enseñarme a luchar para cumplir mis sueños y a valorar las cosas importantes de la vida. A mis hermanos a los que adoro con todo mi corazón y que están siempre a mi lado, con sus consejos y palabras de aliento. También a mi abuela, por rezar tanto por mí, por estar dispuesta a darme una mano cada vez que lo he necesitado y por el inmenso cariño recibido.

A mi hija, Anabella, el solcito que ilumina cada uno de mis días, llenándolos de amor y felicidad, dándome las fuerzas necesarias para poder cumplir mis objetivos.

Mi más profundo agradecimiento a Pablo y Gabriela, quienes han dirigido con dedicación y esfuerzo esta tesis. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su perseverancia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación. Han inculcado en mí el sentido de seriedad, responsabilidad y amor por lo que hacen, ganándose mi lealtad y admiración. Siempre les estaré agradecida por haberme permitido trabajar con ellos y por todo lo recibido durante el tiempo que ha durado esta tesis.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Joana y Vanda, por su importante aporte y participación en el desarrollo de esta tesis.

A todas las personas que forman parte de la Cátedra de Fitopatología, especialmente a Cuca, Susi, Jorge, Clara y Caro por todos los momentos compartidos, por la amabilidad y predisposición a ayudar. Simplemente por hacer del lugar de trabajo un sitio agradable donde uno se siente contenido y apoyado. Gracias por los ricos cafecitos y las divertidas charlas que amenizaron el trabajo.

A todos los amigos y compañeros con los que he tenido la posibilidad de compartir esta experiencia, que me han animado y ayudado, que han estado siempre dispuestos a aconsejarme y escucharme.

A todos ellos,

Muchas gracias de todo corazón.

RESUMEN	ii
I- INTRODUCCIÓN.....	3
I-1. Podredumbre morena producida por <i>Monilinia</i> spp.	3
I-2. Patogenia	5
I-3. Manejo de la enfermedad	7
I-4. Extractos vegetales	9
II- OBJETIVOS	14
II-1. Objetivo general	14
II-2. Objetivos particulares	14
III- HIPÓTESIS	15
III-1. Hipótesis general	15
III-2. Hipótesis particulares	15
IV- MATERIALES Y MÉTODOS	16
IV-1. Ubicación del estudio	16
IV-2. Origen del aislado de <i>M. fructicola</i>	16
IV-3. Material vegetal.....	16
IV-4. Obtención de los extractos vegetales.....	16
IV-5. Ensayos <i>in vitro</i>	17
IV-5.1. Determinación de la inhibición de la germinación y el crecimiento del tubo germinativo de conidios de <i>M. fructicola</i> tratados con extractos de las distintas especies vegetales.	17
IV-5.2. Determinación de la cinética de inhibición de la germinación de conidios de <i>M. fructicola</i> tratados con el extracto con mejor performance en la germinación y el crecimiento del tubo germinativo.....	18
IV-5.3. Determinación de la inhibición del crecimiento del micelio de <i>M. fructicola</i> en medio adicionado.	19
IV-5.4. Determinación del efecto de los compuestos volátiles presentes en el extracto vegetal sobre el crecimiento del micelio de <i>M. fructicola</i>	21
V - RESULTADOS	22
V-1. Ensayos <i>in vitro</i>	22

V-1.1. Inhibición de la germinación de conidios de <i>M. fructicola</i> tratados con los extractos de las distintas especies vegetales.	22
V-1.2. Inhibición del crecimiento del tubo germinativo de conidios de <i>M. fructicola</i> tratados con los extractos de las distintas especies vegetales.....	23
V-1.3. Inhibición de la germinación de conidios de <i>M. fructicola</i> tratados con extracto de jarilla.	24
V-1.4. Determinación de la cinética de inhibición de la germinación de conidios de <i>M. fructicola</i> tratados con extracto de jarilla.	26
V-1.5. Inhibición del crecimiento del tubo germinativo de conidios de <i>M. fructicola</i> tratados con extracto de jarilla a diversas concentraciones.	28
V-1.6. Inhibición del crecimiento del micelio de <i>M. fructicola</i> en medio adicionado con extracto de jarilla a distintas concentraciones	31
V-1.7. Determinación del efecto de los compuestos volátiles presentes en el extracto acuoso de jarilla sobre el crecimiento del micelio de <i>M. fructicola</i>	34
VI- DISCUSIÓN.....	37
VII- CONCLUSIONES	40
VIII- BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	42

I- INTRODUCCIÓN

La podredumbre morena es una de las enfermedades más graves de los frutales de carozo a nivel mundial, principalmente en zonas donde las primaveras y los veranos son húmedos y cálidos, y puede ocasionar grandes pérdidas de producción y serios problemas de comercialización. En EE.UU. existen referencias de daños que oscilan entre el 20 y 35% de pérdida de producción aún con la aplicación de estrictos programas de manejo de la enfermedad. En la provincia de Mendoza, es junto con la viruela de los frutales de carozo la enfermedad más perjudicial del cultivo, por sus daños difícilmente controlables en veranos lluviosos (Pizzuolo *et al.*, 2011). La producción total estimada de frutas de carozo en Mendoza, para la temporada de cosecha frutícola campaña 2012/2013 fue de 511.284 tn. En la última campaña (2012/2013) en Argentina se exportaron 14.400 tn. de frutas de carozo. Una de las mayores dificultades que existe actualmente para la exportación de estas frutas son las podredumbres, especialmente la producida por *Monilinia fructicola*, dado que el patógeno es cuarentenario en Europa (Rossini *et al.*, 2007).

I-1. Podredumbre morena producida por *Monilinia* spp.

La podredumbre morena de los frutales de carozo puede ser ocasionada por tres especies de hongos pertenecientes al género *Monilinia* que en su fase asexual se clasifican en el género *Monilia*. Las especies responsables de la enfermedad son *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey (f.a. *Monilia fructicola*), *M. laxa* (Aderh. y Ruhl.) Honey (f.a. *Monilia laxa*) o *M. fructigena* (Aderh. y Ruhl.) Honey (f.a. *Monilia fructigena*). *M. fructicola* se encuentra distribuida en los Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, Canadá, Centro y Sud América, Sud África, Francia, España, Austria y Japón; *M. fructigena* se encuentra en Europa, Egipto, Marruecos (norte de África), Turquía, Irán, India, China, Japón Brasil, Uruguay y Argentina y *M. laxa* en Europa, Turquía, Siria, Medio Oriente, Afganistán, China, Japón, Sud África, algunos estados de Estados Unidos, Guatemala (Centro América), Sud América, Australia y Nueva Zelanda (Pizzuolo, 2001). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en Europa en 1796, mientras que en Estados Unidos recién en 1807.

Las tres especies del género *Monilinia* citadas anteriormente son responsables de la podredumbre de frutos, además pueden causar marchitamiento y atizonado de flores, lesiones en hojas, muerte de brotes y canchales en ramas. Los frutos pueden ser atacados en cualquier fase de su desarrollo pero, son más susceptibles cuando se encuentran maduros. El síntoma inicial en fruto consiste en una mancha parda, circular que crece rápidamente. Luego el tejido dañado manifiesta una podredumbre blanda esponjosa que evoluciona a seca. Poco después de observarse los síntomas aparecen los signos formando un moho, en muchas ocasiones con aspecto

pulverulento (fructificaciones asexuales del patógeno). Este último suele presentarse en forma de anillos concéntricos con zonas chatas y otras sobreelevadas con una mayor concentración de fructificaciones. El color del moho puede variar desde el amarillo ocre, blanco grisáceo, ceniciento al pardo claro (Figura I-1A, B y C). Generalmente la mayor parte de los frutos afectados caen y unos pocos permanecen momificados en el árbol (Figura I-1D) (Pizzuolo et al., 2011).

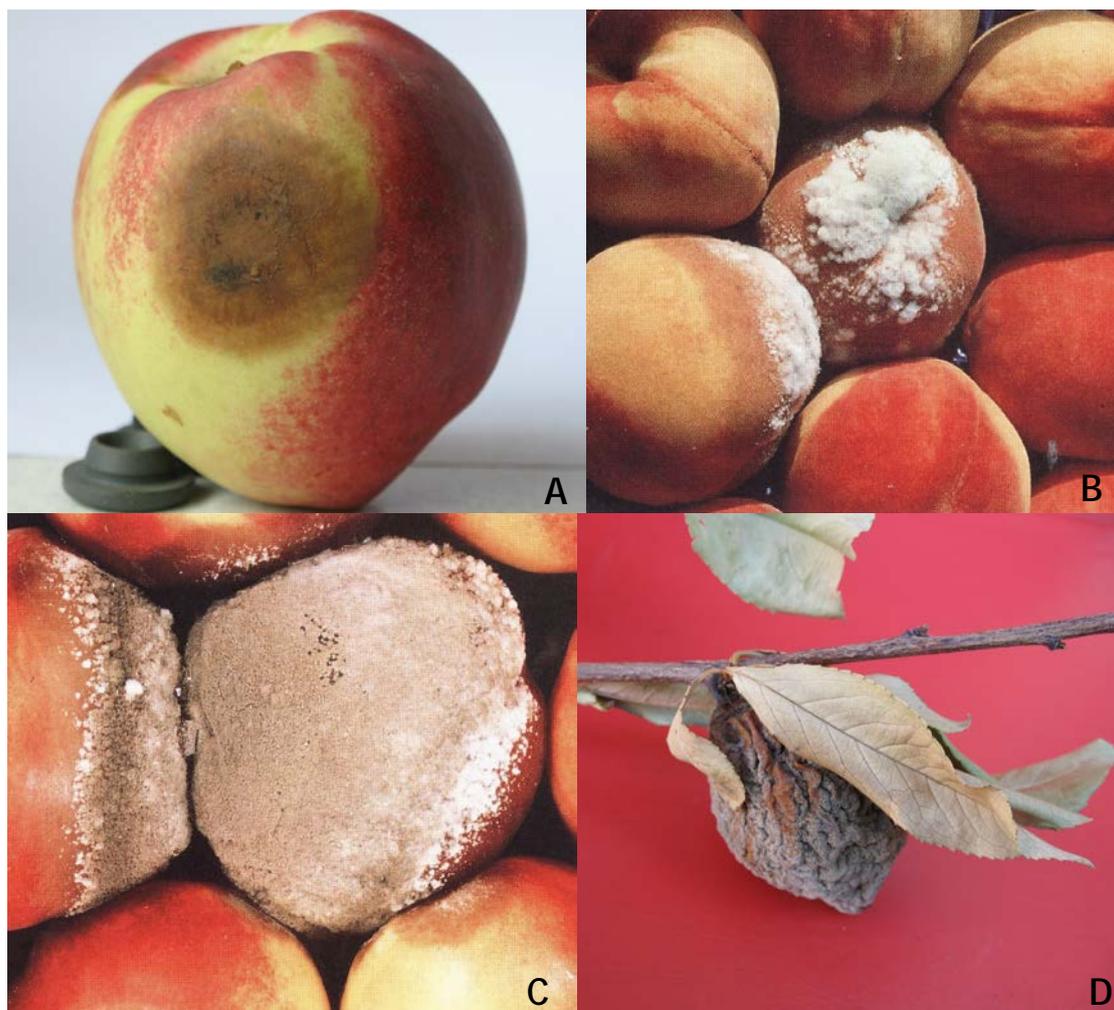


Figura I -1. A, B, C y D. Duraznos afectados por la podredumbre morena de los frutales de carozo, en ellos se pueden observar los síntomas y los signos de la enfermedad. En "D" Fruto momificado.

En su fase asexual el hongo produce conidios hialinos, elípticos en cadenas sobre hifas dispuestas en grupos o ramilletes (esporodoquios). También pueden observarse microconidios (espermacios) en cultivo y en frutos momificados. Estos últimos se producen en cadenas a partir de conidióforos en forma de botella y, aun cuando no germinen, al parecer tendrían alguna función en la reproducción sexual del hongo (Agrios, 2005). En su fase teleomórfica el hongo forma apotecios a partir de las costras esclerociales ubicadas en la superficie de los frutos momificados parcial o

totalmente enterrados en el suelo. Estos aparecen como pequeñas prominencias en forma de bulbo, las cuales se alargan para dar origen a un estípite, de largo variable entre 5 y 28 mm. Conforme este estípite emerge del suelo, su porción superior se hincha y aparece una depresión en la punta. El desarrollo posterior de los costados de ese hinchamiento forma una estructura que asemeja a una copa, la cual tiene, inicialmente, el aspecto de un embudo y más tarde de un disco. La superficie superior o interior del apotecio se encuentra cubierta por miles de ascos cilíndricos entremezclados con paráfisis. Cada uno de los ascos contiene 8 ascosporas unicelulares (Figura I-2 A y B). En un fruto momificado pueden formarse entre 1 y 20 apotecios.

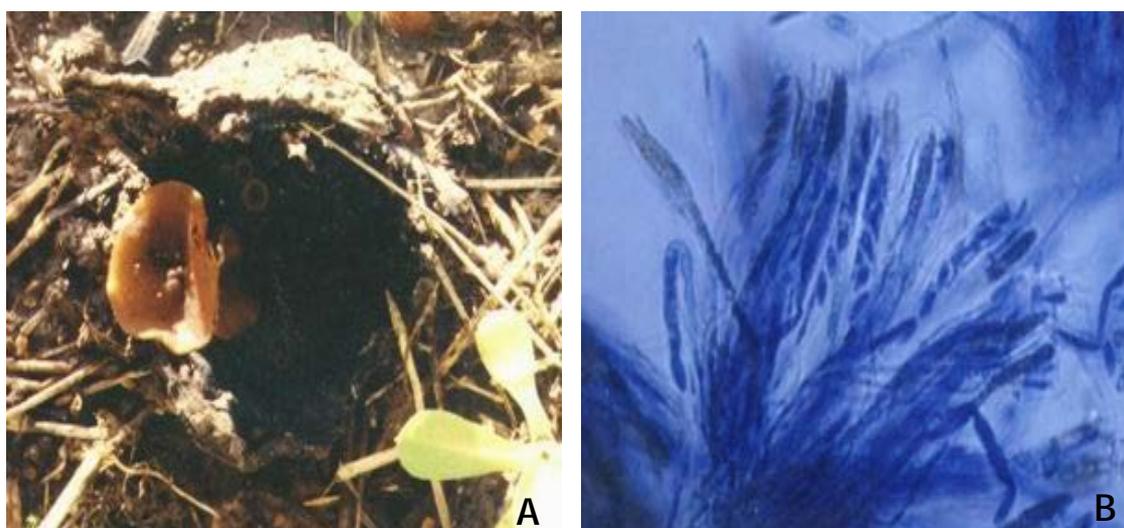


Figura I-2. A. Apotecios de *Monilinia fructicola* emergiendo a partir de un fruto momificado parcialmente enterrado en el suelo. B. Corte de un apotecio visto al microscopio, se pueden observar los ascos conteniendo 8 ascosporas cada una y las paráfisis.

I-2. Patogenia

El patógeno inverna en forma de micelio en los frutos momificados que se encuentran todavía en los árboles o caídos en el suelo y en los canchales de las ramitas infectadas, o bien en forma de costra pseudoesclerocial en los frutos momificados (Figura I-3). En la primavera, el micelio produce nuevos conidios, mientras que a partir de la costra pseudoesclerocial pueden originarse los apotecios, los cuales forman ascos y ascosporas.

Tanto los conidios como las ascosporas pueden afectar a las flores. Los conidios son llevados por el viento, el agua de lluvia y salpicaduras o los insectos hacia los verticilos florales. Las ascosporas que salen con fuerza del asco forman una especie de nube sobre el apotecio y las corrientes de aire las llevan entonces hacia las flores.

Los conidios y las ascosporas una vez depositados sobre la superficie del hospedante, germinan y producen infección al cabo de unas cuantas horas.

El micelio del hongo, que coloniza los tejidos vegetales cuando el tiempo es húmedo, produce hifas cortas que se reúnen, ejercen presión hacia el exterior a nivel de la epidermis y forman numerosos conidióforos sobre los verticilos florales afectados a partir de los cuales el hongo libera nuevas masas de conidios. Al mismo tiempo, el micelio del hongo avanza con gran rapidez hacia los tejidos del pedúnculo de las flores y de ahí a las brindillas. En estas últimas, el micelio ocasiona la desintegración y el colapso de las células en torno a la zona de ingreso y forma un cancro, de color café rojizo. El cancro puede llegar a circundar las ramitas de tal forma que producen una muerte descentente de la misma. En poco tiempo, la superficie del cancro se cubre con los signos del patógeno (Agrios, 2005).

Las flores atizonadas por el hongo, adheridas al árbol y cubiertas por las fructificaciones del patógeno junto con los conidios producidos en los canchros de las brindillas, constituirán la fuente de inóculo de las infecciones secundarias que sufrirán los frutos a medida que éstos maduren (Agrios, 2005).

La susceptibilidad de los frutos a la infección aumenta con la maduración de éstos (Agrios, 2005). Comúnmente, la penetración en los frutos se produce a través de heridas de diversa índole presentes en la superficie de los frutos, sin embargo, ésta puede ocurrir también directamente a través de la cutícula. El hongo crece intercelularmente al principio y mediante la secreción de enzimas, principalmente del tipo pectolíticas, produce la maceración y el empardecimiento de los tejidos que ha infectado. El hongo crece con gran rapidez y conforme avanza en el fruto, produce los signos en la zona afectada, lo cual facilita la dispersión de la enfermedad. Los frutos pueden podrirse totalmente al cabo de algunos días y desprenderse del árbol (carpoptosis) si bien algunos de ellos pueden mantenerse adheridos a las brindillas. Los frutos que se mantienen suspendidos en el árbol, rápidamente pierden humedad, se arrugan y al final de la estación de crecimiento se transforman en momias (Figura I-1.D). La epidermis del fruto sigue siendo la cubierta protectora y debajo de ella los restos de las células del fruto se mantienen en su sitio debido a los filamentos miceliales del hongo que se encuentran estrechamente entretejidos y forman una corteza dura (costra esclerocial). Una vez que el fruto se ha momificado, puede caer al suelo, y persistir ahí durante dos o más años (Agrios, 2005).

Los frutos afectados sin síntomas aparentes y que fueron cosechados se pudren durante la etapa de empaque, almacenamiento o transporte, siendo éstos fuente de inóculo de los frutos sanos que entren en contacto con ellos. También los conidios que quedan en los bins o cajones, liberados por las fructificaciones producidas en los

frutos, son fuente de inóculo en cualquier momento, comprendido entre la cosecha y consumo. (Agrios, 2005).

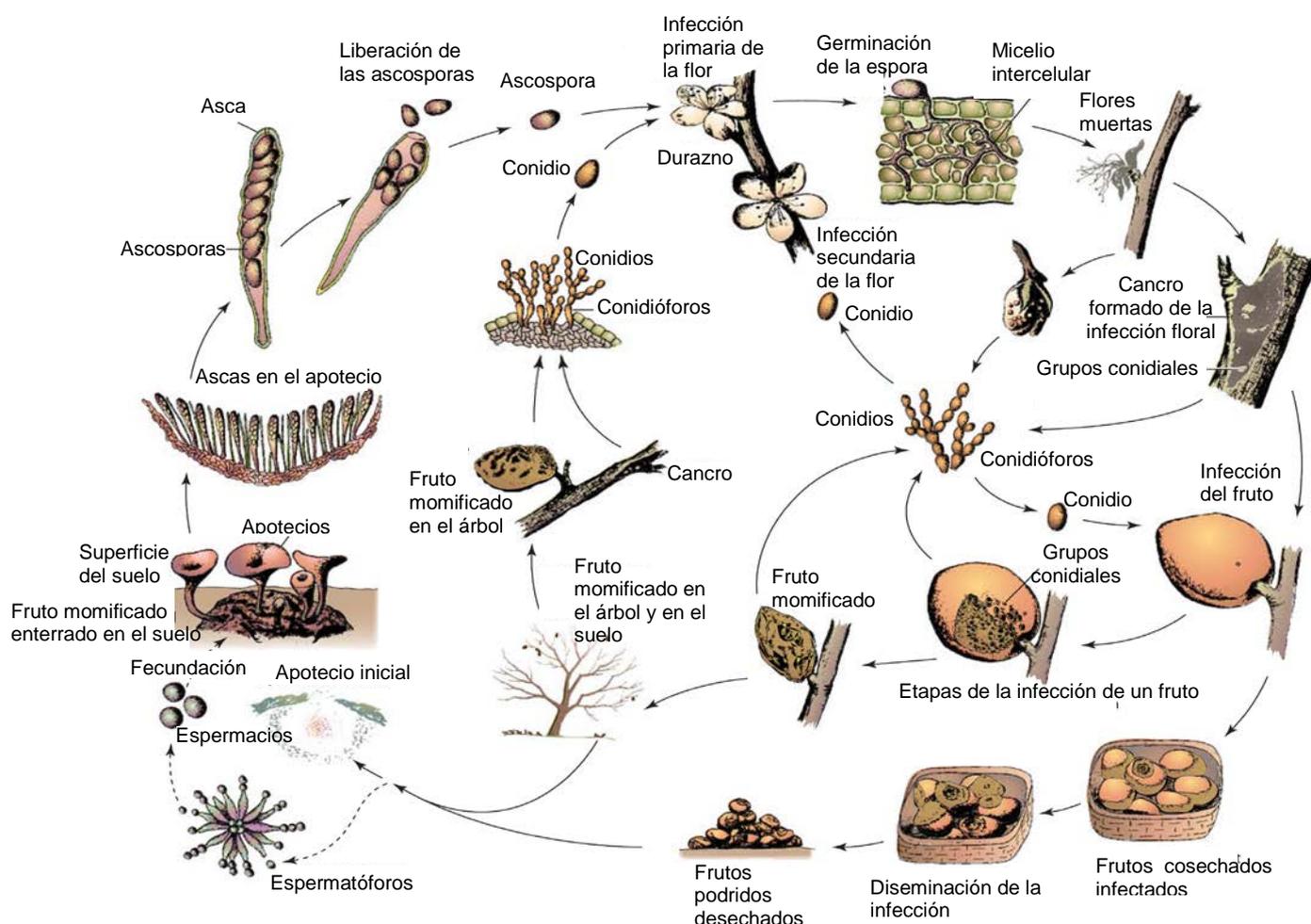


Figura I-3. Ciclo bioecológico de *M. fructicola*, agente responsable de la podredumbre morena de los frutales de carozo. (Agrios, 2005)

I-3. Manejo de la enfermedad

Un manejo adecuado requiere la implementación de un conjunto de medidas orientadas a prevenir los daños, por lo tanto el uso de varias técnicas en conjunto mejora la eficiencia de control y un apropiado monitoreo resulta imprescindible. Debe recurrirse a medidas culturales tendientes a la reducción del potencial de inóculo presente en el monte, como la eliminación fuera del cultivo de frutos momificados en las plantas o caídos en el suelo y las ramas con canchales. También desinfección de los elementos utilizados en la cosecha, entre éstos los cajones, con productos como dióxido de cloro, lavandina o formalina. El manejo adecuado de factores que pueden ocasionar heridas como insectos, aves, granizo, desequilibrios hídricos, ramaleo y

.....

lesiones durante la cosecha también resulta de utilidad. La adecuación del microclima de la canopia, mediante una apropiada poda, permite lograr mayor insolación y una adecuada aireación que disminuye la presencia de agua libre sobre los órganos y facilita la distribución uniforme de los agroquímicos. Respecto a la aplicación de distintos microorganismos tanto hongos como bacterias que actúan como controles biológicos, entre algunos de ellos *Trichoderma viridae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas corrugada*, *Epicoccum purpurascens*, distintas investigaciones muestran una eficiencia de control variable, probablemente por la elevada dependencia entre las condiciones ambientales propias del lugar y el establecimiento del biocontrolador. Por ello, el productor debe tomar con precaución el empleo de esta alternativa de manejo de la enfermedad (Pizzuolo *et al.*, 2011). El control químico apunta a proteger a la planta en los dos estados de máxima susceptibilidad: floración y madurez del fruto. En este sentido los fungicidas más usados son: polisulfuro de calcio, azufre, dicarboximidas (captan, folpet), benzimidazoles (benomil, metil tiofanato, carbendazim) e inhibidores de la síntesis del ergosterol (triforine, propiconazol) (Rossini *et al.*, 2007). Generalmente el uso continuado de un mismo principio activo produce la selección de cepas resistentes como por ejemplo a los benzimidazoles. Mitidieri (2003) detectó en la zona de San Pedro cepas de *M. fructicola* resistentes a carbendazim aisladas a partir de frutos de durazno provenientes de galpones de empaque. Ma *et al.* (2003) observaron dos niveles de resistencia (bajo y alto) a benomil y metil tiofanato en cepas de *M. fructicola* aisladas de frutales de carozo en cultivos en California. Guizzardi *et al.* (1995) realizaron estudios *in vitro* sobre la sensibilidad de algunas cepas de *M. laxa* a benzimidazoles y dicarboximidas (benomil, vinclozolin, procymidone e iprodione) en la fase de poscosecha. Varias de las cepas estudiadas mostraron baja sensibilidad e incluso resistencia a los fungicidas ensayados.

En algunos países el empleo de fungicidas de síntesis para el control poscosecha de la podredumbre morena no está autorizado y sólo se permite el empleo de este tipo de producto en tratamientos a campo previo a la cosecha según periodo de carencia establecido. En otros, si bien los tratamientos químicos poscosecha están permitidos, la presencia de residuos nocivos en estos frutos limita su exportación a varios mercados extranjeros. Además, la actual demanda de los consumidores por productos sin residuos de plaguicidas y de un manejo respetuoso del medio ambiente implica necesariamente una reducción en el número de aplicaciones de productos químicos y un aumento en la producción de fruta utilizando estrategias orgánicas. (Pizzuolo *et al.*, 2011)

Por esto, existe la necesidad de desarrollar nuevos y efectivos métodos de control, principalmente de las enfermedades de poscosecha, que sean aceptados por el consumidor y que no constituyan un riesgo para la salud humana y el ambiente.

Estos nuevos métodos pueden ser el uso de microorganismos antagonistas, aceites esenciales o de diversos extractos vegetales.

I-4. Extractos vegetales

Antes de que el hombre desempeñara un rol activo en la protección de las plantas, estas ya habían demostrado la capacidad de defenderse por sí solas. Se conoce que sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios (alcaloides, esteroides, flavonoides, terpenoides, quinonas, entre otros), los cuales están implicados en los mecanismos de defensa hacia distintos factores de estrés biótico y abiótico (Wilson *et al.*, 1999; Hernández Lauzardo *et al.*, 2007).

La producción de estos metabolitos secundarios por parte de las plantas, está ligada a diferentes vías metabólicas. La cantidad y diversidad de estos es muy variable y depende del tipo de tejido, edad de la planta, hábitat, tipo de suelo, entre otros (Alcalá *et al.*, 2005). Muchos de estos compuestos son producidos y almacenados en tejidos jóvenes, como hojas, flores y semillas (Cruz De Matos, 2000; Costa Mauro *et al.*, 2001).

El reconocimiento de algunas propiedades biológicas de los metabolitos secundarios o productos naturales es conocido desde hace tiempo, lo que ha motivado su amplio uso en diversos campos como la agricultura y medicina. A partir de ellos se han obtenido diversos fármacos, antibióticos, insecticidas y herbicidas (Croteau *et al.*, 2000). Algunos ejemplos que podemos mencionar son:

- La aspirina utilizada en medicina, resulta de la acetilación del ácido salicílico derivado de una planta del género *Salix* (Theis y Lerchau, 2003).
- Pesticidas empleados en agricultura como la nicotina, la sabadilla (alcaloide veratro), la rotenona y la ryania, son productos extraídos de *Nicotiana tabacum*, *Shoenocaulon officinale*, *Derris elliptica*, *Lonchocarpus utilis* y *Ryania speciosa*, respectivamente (Reigart y Roberts 1999; Buss y Park-Brown 2002).
- Compuestos a base de azadiractina y salanina utilizados en agricultura, se obtienen de las semillas del árbol de Nim (*Azadirachta indica*). Planta ampliamente conocida por sus propiedades antimicrobianas e insecticidas (Reigart y Roberts 1999; Buss y Park-Brown 2002).
- Los piretros o piretrinas son insecticidas ampliamente utilizados en agricultura. Son sustancias aisladas de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Los piretroides han sido sintetizados e imitan la acción de

las piretrinas (Kurihara *et al.* 1997; Reigart y Roberts, 1999; Buss y Park-Brown, 2002).

La búsqueda de nuevos compuestos útiles para el control de plagas y enfermedades de importancia económica, ha despertado el interés por el estudio de los extractos vegetales. Ferget en 1994 propuso la utilización de extractos vegetales para contrarrestar problemas fitosanitarios, aprovechando la presencia de los metabolitos secundarios en estas sustancias. Con esto Ferget no pretendía redescubrir tecnologías que hace mucho tiempo se vienen practicando en el manejo de plagas y enfermedades de los cultivos, sino validar esta información y adaptarla para poner en práctica el concepto de desarrollo sostenible, económicamente rentable, ecológicamente viable y socialmente manejable (Ferget, 1994).

La obtención de extractos vegetales y el estudio de sus compuestos activos, propician su empleo contra diferentes fitopatógenos en poscosecha para controlar enfermedades en productos frutihortícolas (Hernández Lauzardo *et al.*, 2007). El proceso de obtención de extractos a partir de diferentes materiales vegetales (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces) es variable; pudiéndose obtener extractos acuosos (Bautista *et al.*, 2002), polvos (Bautista *et al.*, 2003) o utilizar otros disolventes para extraer diferentes compuestos, según su polaridad (Abou-Jawdah *et al.*, 2002).

El uso de extractos vegetales ha sido de gran utilidad a través de la historia (Theis y Lerdau, 2003). La humanidad ha obtenido enormes beneficios del estudio de las propiedades medicinales de las plantas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2003 considera que el amplio número de plantas todavía no estudiadas, representa un valioso recurso potencial que debe ser explorado. El interés por las plantas medicinales ha sido y es permanente (Roig, 2002), pero su empleo ha tenido un marcado y ascendente auge en el ámbito mundial, a partir de que la OMS llamó a introducir recursos medicinales tradicionales en los sistemas de salud en 1977 (OMS, 2003).

En la actualidad existen diversos extractos vegetales que han sido estudiados con éxito (Wilson *et al.*, 1997; Ribeiro y Bendendo, 1999; Ficker *et al.*, 2003; Ferreira *et al.* 2005) y han demostrado efectividad contra diferentes hongos fitopatógenos. Entre los diversos extractos estudiados puede mencionarse a modo de ejemplo: ajo (*Allium sativum* L.), acuyo (*Piper auritum* HBK), guayaba (*Psidium guajava* L.) eucalipto blanco (*Eucalyptus globulus* Labill.) (Baños *et al.*, 2004); duraznero (*Prunus persica* (L.) Batsch), guamúchil (*Pithecellobium dulce* Roxb. Benth), chicozapote (*Achras sapota* L.), chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), zapote blanco (*Casimiroa adulis* Llav. Et Lex), limón (*Citrus limon* L.), tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. Et Sess), papaya (*Carica papaya* L.), guayaba (*Psidium guajava* L.), aguacate (*Persea*

.....

americana Mill.), ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L.) (Bautista *et al.*, 2002); huamuchil (*Pithecellobium dulce* Roxb. Benth) (Bautista *et al.*, 2003; 2004a); ajedrea (*Satureja hortensis* L.) (Boyras y Ozcan, 2006); pimiento (*Capsicum frutescens* L.) (Bautista *et al.*, 2004b); lupino (*Lupinus exaltus* Zucc.) (Bernal *et al.*, 2005); urunday (*Astronium balansae*), chañar (*Geoffroea decorticans*), yvyrá-Pytá (*Peltophorum dubium*), mandubí-ra (*Geoffroea spinosa*) salvia morada (*Lantana balansae*), itin (*Prosopis kuntzei*), vinal (*Prosopis ruscifolia*) y palo santo (*Bulnesia sarmientoi*) (Salvat *et al.*, 2004); *Mentha piperita*, *Ricinos communis* (Amorim *et al.*, 2004).

En Argentina, relevamientos etnobotánicos realizados en la Patagonia revelan el uso de plantas autóctonas como agentes de control de diferentes plagas y enfermedades en diversos cultivos. Entre estas especies nativas se destacan *Azara lanceolata* (corcoven o aramo) para fumigaciones, *Adesmia boronoides* (paramela) como piojicida, *Psilas partioide* como repelente de insectos, entre otras (Cremer y Giayetto, 2005). Basándose en los usos populares de las plantas medicinales y especies nativas de la región se podrían identificar diversos recursos botánicos con propiedades antimicrobianas, para ser utilizados en el control de plagas y enfermedades en poscosecha de frutas y hortalizas (Cremer y Giayetto, 2005), tales como:

- *Tessaria absinthioides* (Hook. & Arm.) DC., nombre común "Pájaro bobo" es un arbusto o subarbusto densamente pubescente. Hojas subcrasas, pecioladas, oblanceoladas, íntegras o aserradas hacia el ápice, densamente cano-tomentosas, capítulos subsésiles o cortamente pedunculados, ordenados en cimas corimbosas, terminales, multicéfalas. Flores rosadas o lilacinas, dimorfas. Sus hojas son usadas como hipocolesterolemiantes, balsámicos y expectorantes. Por sus raíces gemíferas forma manchones a lo largo de acequias y ríos. Crece en el centro y sur de Córdoba, centro de San Luis, La Rioja, San Juan, Catamarca. Además, desde Chubut y Buenos Aires hasta Jujuy. También en Chile, Bolivia y Uruguay (Barboza *et al.*, 2006). En Mendoza, en suelos húmedos y arenosos y a orillas de acequias y canales de riego en toda la provincia (Ruiz Leal, 1972).
- *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth., nombre vulgar "retortuño", es un arbusto rizomatoso. Tallos flexuosos, estriados longitudinalmente. Hojas pequeñas, bipinnadas, uniyugas. Flores amarillas en cabezuelas globosas. Frutos de color amarillo claro, formando una densa espiral cerrada, con 6-17 espiras, generalmente de 4-7 cm de longitud. Distribuido desde San Juan a Buenos Aires, hacia el sur hasta Río Negro, y al norte alcanza a Tucumán. El extracto acuoso posee actividad antibacteriana. El fruto es utilizado como antidiarreico, astringente, antiinflamatorio,

odontálgico (Barboza *et al.*, 2006). También se han observado efectos antitumorales (Oberti *et al.*, 2012).

- *Larrea divaricata* Cav. pertenece a la familia Zygophyllaceae, comúnmente llamada "jarilla", es un arbusto ramoso, hasta 3 m de altura, de tallos leñosos. Hojas pubescentes, bifoliadas; folíolos soldados no más allá de la mitad de su longitud y un tercer folíolo central, en forma de mucrón filiforme, pequeño. Flores solitarias. Especie de alta distribución en la Argentina, característica de regiones secas. La hoja es usada como antiinflamatorio, antirreumático, dermopático, diaforético, febrífugo, emenagogo, oxitócico, pediluvio, antidontálgico, antitusivo, la parte aérea es usada como insecticida (Barboza *et al.*, 2006). El extracto etanólico de las partes aéreas de *L. divaricata* Cav. inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos y levaduras (Quiroga *et al.*, 2004; Davicino *et al.*, 2007). El extracto acuoso presenta efectos antitumorales, antimicrobianos, antioxidantes y actividad antiinflamatoria (Davicino *et al.*, 2011; Micucci *et al.*, 2011).

- *Schinus molle* L., nombre común aguaribay. Es un árbol de ramas péndulas y delgadas. Hojas alternas, verde-grisáceas, compuestas, imparipinnadas. Flores de color verde-amarillento. Drupas esferoides, rojizas. Las hojas se utilizan como laxante, antirreumático, antiinflamatorio, emenagogo. Habita desde La Pampa hasta Jujuy. Ampliamente distribuido en Mendoza (Barboza *et al.*, 2006).

- *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. F. & Arn.) Burkart, comúnmente conocido como chañar, es un arbusto o árbol de 3-10m de altura con tronco de corteza verdosa caediza en placas longitudinales. Las hojas son compuestas pinadas, con 3-9 folíolos. Las flores son amarillo-anaranjadas, con estrías rojizas y se agrupan en racimos o también se encuentran solitarias en el comienzo de la primavera. Los árboles son muy vistosos en floración. El fruto es una drupa globosa (Silva *et al.*, 2004). La pulpa de los frutos es comestible y carnosa (Universidad de Arizona, 1998), aunque resulta áspera al paladar (Quiroga *et al.*, 2009). Esta especie en nuestro país, se distribuye desde Jujuy hasta el norte de la Patagonia (Ruiz Leal, 1972) y es la más representativa del bosque seco del Chaco argentino, formando parte de la región fitogeográfica más grande de América del Sur (Eynard y Galleto, 2002). También se localiza en el Norte de Chile, Bolivia, Chaco Paraguayo y Oeste de Uruguay. En Santa Fe, Argentina, es considerada invasora de pastizales naturales, ya que disminuye su valor para uso ganadero. Por ello tanto es manejado como una maleza (Ulibarri *et al.*, 2002). En medicina popular se usan las flores, frutos, corteza y hojas por sus virtudes

.....
emolientes, balsámicas, expectorantes y antiasmáticas (Roig, 2002; Quiroga *et al.*, 2009).

La demanda creciente de alimentos a nivel mundial asociada al natural incremento de la población y a la exigencia por parte de los consumidores de productos de óptima calidad obtenidos mediante procesos que respeten el medio ambiente, justifica la continua búsqueda de alternativas de manejo de los cultivos y su producción por métodos ecológicamente aceptables. Las plagas y enfermedades de los cultivos representan uno de los factores con mayor incidencia tanto cualitativa como cuantitativa en la producción. En muchas ocasiones el manejo sanitario de estos inconvenientes resulta dificultoso ya sea por la toxicidad de los agroquímicos empleados, los residuos que dejan o sus efectos negativos sobre la salud humana, de animales y del medio ambiente en general. Todo ello conduce a la imperiosa necesidad de adaptar los sistemas productivos de modo tal que resulten sustentables para el medio ambiente y la población.

El empleo de productos naturales, no nocivos para el ser humano y obtenidos por metodologías sencillas podría representar una alternativa de manejo fitosanitario de los cultivos válida. Es por ello que en la presente tesis se pretende estudiar la bioactividad de los extractos vegetales de distintas especies de la flora autóctona o presente desde antaño (chañar, jarilla, pájaro bobo, retortuño y aguaribay) hacia *M. fructicola*, responsable de las principales pérdidas en cultivo y poscosecha de frutas de carozo.

II- OBJETIVOS

II-1. Objetivo general

- Determinar la capacidad de inhibición de extractos vegetales acuosos de chañar, retortuño, aguaribay, pájaro bobo y jarilla sobre *M. fructicola*.

II-2. Objetivos particulares

- Determinar la capacidad de inhibir la germinación y el crecimiento del tubo germinativo de conidios de *M. fructicola* de los extractos vegetales acuosos de chañar, retortuño, aguaribay, pájaro bobo y jarilla a distintas concentraciones.
- Determinar la cinética de inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* en diferentes tiempos de contacto y distintas concentraciones del extracto vegetal acuoso con mejor comportamiento en la inhibición de la germinación de conidios.
- Determinar la capacidad de inhibir el crecimiento del micelio de *M. fructicola* del extracto vegetal acuoso con mejor comportamiento en la inhibición de germinación de conidios.
- Determinar del efecto de los compuestos volátiles presentes en el extracto vegetal acuoso con mejor comportamiento en la inhibición de la germinación de conidios, sobre el crecimiento del micelio de *M. fructicola*.

III- HIPÓTESIS

III-1. Hipótesis general

- Los extractos vegetales acuosos de chañar, retortuño, aguaribay, pájaro bobo y jarilla tienen la capacidad de inhibir a *M. fructicola*.

III-2. Hipótesis particulares

- Los extractos vegetales acuosos de chañar, retortuño, aguaribay, pájaro bobo y jarilla tienen la capacidad de inhibir la germinación y el crecimiento del tubo germinativo de conidios de *M. fructicola*.
- La capacidad de inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* es variable en función del tiempo de contacto y la concentración del extracto vegetal acuoso.
- El extracto vegetal acuoso con mejor comportamiento en la inhibición de germinación de conidios tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del micelio de *M. fructicola*.
- Los compuestos volátiles presentes en el extracto vegetal acuoso con mejor comportamiento en la inhibición de conidios tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del micelio de *M. fructicola*.

IV- MATERIALES Y MÉTODOS

IV-1. Ubicación del estudio

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias- Universidad Nacional de Cuyo, ubicada en Chacras de Coria, Luján de Cuyo - Mendoza, Argentina (33°00'24'' S, 68°52'18'' O, elevación 939 m).

IV-2. Origen del aislado de *M. fructicola*

Para los estudios se utilizó un aislado de *M. fructicola* obtenido a partir de duraznos de un monte frutal ubicado en el departamento de Luján de Cuyo (Mendoza), el cual formaba parte de la colección de microorganismos que posee la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias- UNCuyo. Se utilizó agar papa glucosado (APG) acidificado con ácido láctico como medio de cultivo para el crecimiento del patógeno.

IV-3. Material vegetal

En el presente estudio se utilizaron hojas de las siguientes especies vegetales:

Larrea divaricata (jarilla) obtenida del pedemonte del departamento de Luján de Cuyo.

Schinus molle (aguaribay) y *Geoffroea decorticans* (chañar), obtenidos de Chacras de Coria, departamento de Luján de Cuyo.

Prosopis strombulifera (retortuño) y *Tessaria absinthioides* (pájaro bobo), obtenidos del departamento de Lavalle.

IV-4. Obtención de los extractos vegetales

Para la obtención de los extractos acuosos se siguió la metodología utilizada por Widmer y Laurent (2006), que se describe a continuación: se pesaron 20 gramos de folíolos frescos de la especie vegetal y se colocaron en un erlenmeyer de 500 mL que contenía 200 mL de agua destilada. Luego se colocó, el erlenmeyer tapado, en autoclave durante 45 minutos a 121°C y una atmósfera de presión. Posteriormente se filtró el líquido a través de gasa, de modo de separar los folíolos. Posteriormente, se redujo el volumen del líquido filtrado por calentamiento hasta obtener 20 mL. El extracto se centrifugó, para eliminar los sólidos remanentes, a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se colocó en contenedores de vidrio y se esterilizó durante 20 minutos a 121°C y una atmósfera de presión. Luego el extracto obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

IV-5. Ensayos in vitro

IV-5.1. Determinación de la inhibición de la germinación y el crecimiento del tubo germinativo de conidios de *M. fructicola* tratados con extractos de las distintas especies vegetales.

Para determinar el efecto de los extractos acuosos sobre la germinación y el crecimiento del tubo germinativo de conidios de *M. fructicola*, se utilizó la técnica de microcultivo en terreno líquido descrita por Chilosi *et al.* (2000) la cual, se detalla a continuación: en primer lugar se preparó una suspensión acuosa de conidios de *M. fructicola*, para ello se agregaron 2 mL de agua destilada estéril a una colonia del microorganismo en activo crecimiento, luego se deslizó suavemente una varilla de vidrio acodada sobre la superficie de la colonia, a fin de desprender cuidadosamente los conidios del micelio. La suspensión fue recolectada en un frasco de vidrio estéril y la concentración de esporas ajustada a $1 \cdot 10^6$ conidios.mL⁻¹.

Una alícuota de la suspensión fue expuesta a la acción de los extractos acuosos de las especies vegetales antes mencionadas, a distintas concentraciones. Las concentraciones que se probaron fueron 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 y 80,0 %. Cada tratamiento consistió en colocar 2 µL de la suspensión de conidios de *M. fructicola* en un portaobjeto excavado, al que se le adicionó el extracto acuoso en volumen necesario a fin de lograr la concentración deseada en un volumen final de 10 µL. Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento y un testigo el que se preparó siguiendo la metodología descrita pero reemplazando el extracto vegetal por agua destilada estéril. Los portaobjetos se colocaron en cajas de Petri con papel de filtro humedecido, a fin de evitar la deshidratación de la suspensión con el extracto. Se incubaron en oscuridad a temperatura de laboratorio ($\approx 21^\circ\text{C}$) durante 16 h. Cumplido dicho período, se paralizó el ensayo agregando una gota de tricolorante de GÜEGÜEN. Luego bajo microscopio óptico se determinó, sobre un total de 100 conidios, el número de esporas germinadas (se consideró germinada cuando el largo del tubo germinativo superó la longitud de la espora). En aquellas germinadas se midió el largo del tubo de 100 conidios por cada repetición, mediante el programa aplicativo Axiovision 3.0.6.1 (Carl Zeiss Vision GmbH).

Por cada concentración ensayada se calculó el porcentaje medio de inhibición de la germinación y crecimiento de largo de tubo germinativo de conidios de *M. fructicola*.

En ambos casos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\bar{x} - \bar{y})}{\bar{x}} \cdot 100$$

Donde:

\bar{x} = media del testigo

\bar{y} = media del tratamiento

Los porcentajes de inhibición obtenidos para las concentraciones estudiadas fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias fueron separadas mediante test de Tuckey con $\alpha \leq 0,05$.

Para profundizar el estudio del extracto, que demostró la mayor capacidad de inhibir la germinación de conidios y el crecimiento del tubo germinativo se incrementó el rango de concentraciones. Estas fueron 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 15,0; 20,0; 50,0 y 80,0 %.

Finalmente, se confeccionó una curva de inhibición mediante regresión, a fin de determinar la concentración del extracto acuoso que inhibe el 50,0 % (CI₅₀) y 95,0% (CI₉₅) la germinación y el crecimiento del tubo germinativo de los conidios de *M. fructicola*.

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas InfoStat versión 2012 y Statgraphics Centurion XVI 16.0.07.

IV-5.2. Determinación de la cinética de inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* tratados con el extracto con mejor performance en la germinación y el crecimiento del tubo germinativo.

Para determinar el efecto sobre la cinética de germinación de los conidios de *M. fructicola* se utilizó la técnica de Rana *et al.* (1997). La misma consistió en poner en contacto una suspensión de conidios del microorganismo con el extracto vegetal a una concentración determinada, durante diferentes intervalos de tiempo. La suspensión de conidios de *M. fructicola* se obtuvo como se describió anteriormente y la concentración se ajustó a $1 \cdot 10^8$ conidios.mL⁻¹.

Las concentraciones de extracto ensayadas fueron de 10,0; 50,0 y 80,0 %. El ensayo consistió en mezclar 20 μ L de la suspensión de conidios del hongo con el extracto en volumen necesario a fin de lograr la concentración deseada en el volumen final de 100 μ L. La mezcla obtenida se homogeneizó mediante vortex. Una vez transcurridos intervalos de tiempo de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de contacto de los conidios con el extracto, una alícuota de 20 μ L de la mezcla fue filtrada bajo vacío a través de membranas esterilizantes de ésteres de celulosa (Millipore) de 0,45 μ m de diámetro de poro. Los conidios retenidos en la membrana fueron lavados dos veces

con 500 μL de agua destilada estéril para eliminar los restos de extracto. Posteriormente, los conidios fueron recuperados en 500 μL de agua destilada estéril y alícuotas de 20 μL de la misma se colocaron en portaobjetos excavados. Éstos se colocaron a incubar en cámara húmeda en oscuridad a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 h. El testigo se preparó siguiendo los mismos pasos, sólo que en lugar de usar extracto se utilizó agua destilada estéril. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, considerándose un portaobjeto una repetición. Una vez cumplido dicho período se dio por finalizado el ensayo agregando tricolorante de Güegüen. Cada portaobjeto fue observado al microscopio óptico para evaluar mediante conteo, el número de conidios germinados y no germinados de un total de 100 de ellos.

Por cada concentración y para cada uno de los períodos de tiempo ensayados, fue calculado el porcentaje medio de germinación. Luego con estos valores, fueron calculados los porcentajes de inhibición en relación al tratamiento testigo usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\bar{x} - \bar{y})}{\bar{x}} \cdot 100$$

Donde:

\bar{x} = media del testigo

\bar{y} = media del tratamiento

Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas mediante test de Tuckey para $\alpha \leq 0,05$.

Finalmente se confeccionó una curva de cinética de inhibición, mediante regresión no lineal para cada concentración de extracto estudiada y se determinó el tiempo necesario para inhibir en un 50,0 % (CI_{50}) y 95,0 % (CI_{95}) la germinación de los conidios de *M. fructicola*.

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas InfoStat versión 2012 y Statgraphics Centurion XVI 16.0.07.

IV-5.3. Determinación de la inhibición del crecimiento del micelio de *M. fructicola* en medio adicionado.

Para determinar el efecto sobre el crecimiento del micelio de *M. fructicola* se utilizó el extracto que mayor efecto inhibitor demostró sobre la germinación de conidios. La técnica empleada fue la descrita por Soliman y Badeaa (2002) y

.....
consistió en hacer crecer al hongo en un medio de cultivo sólido adicionado con el extracto vegetal.

Cada tratamiento consistió en incorporar en forma conjunta, en cajas de Petri de 50 mm de diámetro, 5 mL de APG estéril previamente enfriado aproximadamente a 60°C y el volumen de extracto necesario a fin de obtener las concentraciones de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 y 20,0 % en volumen total de 6 mL. Se usó agua destilada estéril para completar el volumen final. El testigo se preparó siguiendo los mismos pasos, sólo que en vez de agregar extracto se incorporó agua destilada estéril. Una vez solidificado el agar conteniendo la sustancia en estudio, se colocó asépticamente sobre su superficie y en la parte central de la caja, un disco de agar de 5 mm de diámetro colonizado con el hongo. El disco fue obtenido del margen de una colonia del microorganismo en activo crecimiento y cultivado en APG. Luego, las cajas fueron incubadas a 21±2°C hasta que alguno de los tratamientos alcanzó el margen de la misma. Cada tratamiento se realizó por triplicado, considerándose cada caja una repetición. Transcurrido el período de incubación, se midió el área de la colonia, la cual corresponde al crecimiento micelial de *M. fructicola* y de acuerdo a lo descrito por Tripathi *et al.* (2004), se calculó el porcentaje de inhibición micelial mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición micelial} = \frac{ac - at}{ac} \times 100$$

Dónde:

ac= área media de la colonia del testigo.

at= área media de la colonia del tratamiento.

Los porcentajes de inhibición micelial obtenidos para la totalidad de las concentraciones estudiadas fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas mediante test de Tuckey para $\alpha \leq 0,05$.

Finalmente, con estos resultados se confeccionó una curva de inhibición del crecimiento micelial de *M. fructicola*.

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas aplicativos InfoStat versión 2012 y Statgraphics Centurion XVI 16.0.07.

IV-5.4. Determinación del efecto de los compuestos volátiles presentes en el extracto vegetal sobre el crecimiento del micelio de *M. fructicola*.

Para determinar el efecto sobre el crecimiento miceliano de *M. fructicola* se utilizó el extracto que mayor efecto inhibitorio demostró sobre la germinación de conidios. La técnica empleada fue la descrita por Mine Soylu *et al.*, (2006) la cual consistió en colocar en la parte central y sobre la superficie del medio nutritivo (APG) contenido en cajas de Petri de 50 mm de diámetro, un disco de APG de 5 mm de diámetro colonizado por el hongo. Cada caja de Petri estéril contenía 5 mL del medio de cultivo. El disco con el hongo fue obtenido del margen de una colonia de *M. fructicola* en activo crecimiento cultivada en APG. A continuación en el interior de la caja, en la tapa se colocó un disco de papel de filtro estéril, al cual se le adicionaron las siguientes concentraciones crecientes del extracto 5,0; 15,0; 30,0; 45,0; 55,0; 65,0; 75,0; 85,0 y 100,0 %. Luego las cajas de Petri fueron selladas con parafilm y se incubaron en oscuridad a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta que alguno de los tratamientos alcanzó el margen de la misma. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Transcurrido el período de incubación, se midió el área de la colonia, la cual corresponde al crecimiento miceliano de *M. fructicola* y de acuerdo a lo descrito por Tripathi *et al.* (2004), se calculó el porcentaje de inhibición miceliano mediante la misma fórmula utilizada en la técnica descrita en el punto IV-5.3.

Los porcentajes de inhibición miceliano obtenidos para la totalidad de las concentraciones estudiadas fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas mediante test de Tuckey para $\alpha \leq 0,05$.

Finalmente, con estos resultados se confeccionó una curva de inhibición del crecimiento miceliano de *M. fructicola*.

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas aplicativos InfoStat versión 2012 y Statgraphics Centurion XVI 16.0.07.

V - RESULTADOS

V-1. Ensayos *in vitro*

V-1.1. Inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* tratados con los extractos de las distintas especies vegetales.

A partir de la observación microscópica de los conidios tratados y colocados a germinar se pudo determinar que todos los extractos analizados ejercieron en mayor o menor medida un efecto inhibitor. Como puede observarse en la figura V-1 los tratamientos con retortuño al 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 y 80,0 %, aguaribay al 5,0; 10,0; 50,0 y 80,0 %, pájaro bobo al 1,0; 5,0 y 10,0 %, chañar al 1,0; 5,0 y 10,0 % y jarilla al 1,0 % produjeron una inhibición variable entre el 0,0 y 12,0 % no resultando estadísticamente distintos los valores particulares obtenidos. Una inhibición del 100,0 % fue alcanzada por los extractos de pájaro bobo al 50,0 y 80,0 %, chañar al 50,0 y 80,0 % y jarilla al 5,0; 10,0; 50,0 y 80,0 %. Estos últimos si bien no se diferenciaron estadísticamente entre ellos si fueron distintos respecto del grupo mencionado anteriormente.

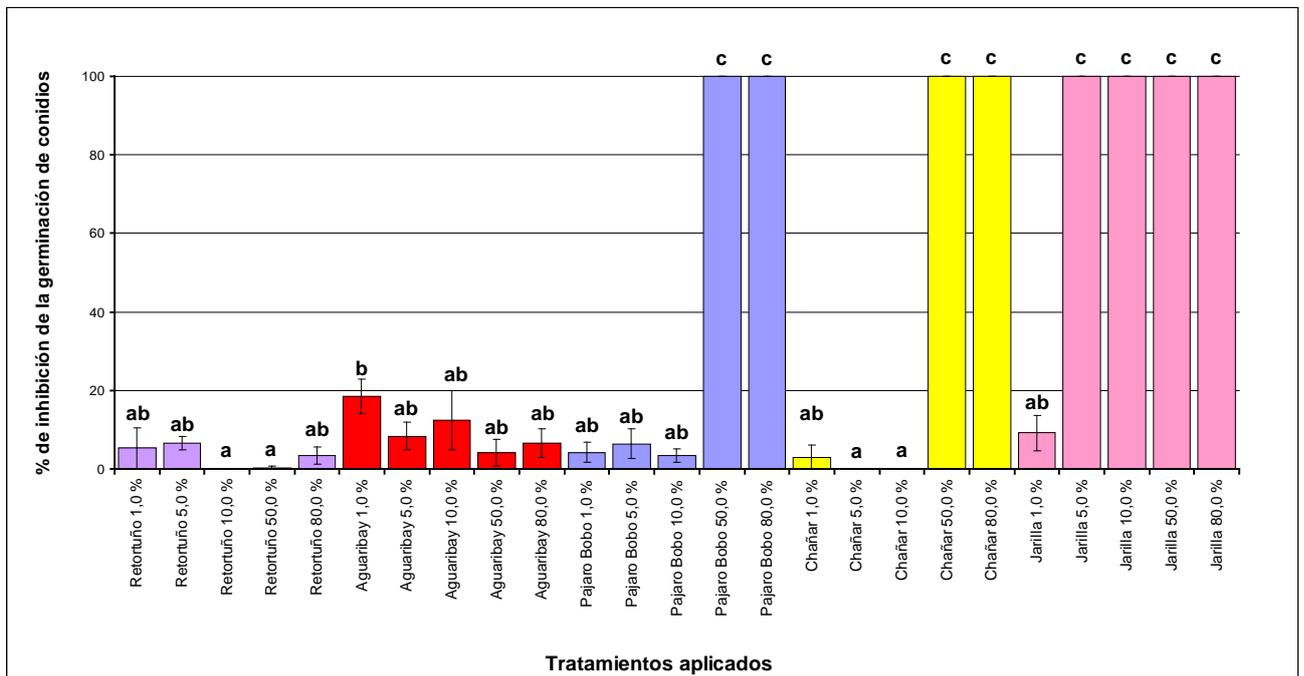


Figura V-1. Porcentaje medio de inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* tratados con extractos vegetales de retortuño, aguaribay, pájaro bobo, chañar y jarilla a las concentraciones de 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 y 80,0 %.

**Letras distintas indican diferencias significativas para test de Tukey ($p \leq 0,05$); las líneas en el extremo de cada columna indican el error estándar.

V-1.2. Inhibición del crecimiento del tubo germinativo de conidios de *M. fructicola* tratados con los extractos de las distintas especies vegetales.

Como se puede observar en la figura V-2 los tratamientos con retortuño y chañar a las menores concentraciones no mostraron un efecto significativo en la inhibición del crecimiento del tubo germinativo, incluso en algunos casos provocaron estimulación del mismo. Sin embargo, en el caso del chañar cuando se empleó a concentraciones mayores (50,0 y 80,0 %) la inhibición llegó al 100,0 %. En el caso de los extractos de aguaribay, pájaro bobo y jarilla, a medida que aumentó la concentración empleada, aumentó el efecto de inhibición del crecimiento del tubo germinativo, alcanzando en el caso del pájaro bobo el 100,0 % con concentraciones del 50,0 y 80,0 %. El extracto de jarilla fue el más efectivo ya que a partir del 5,0 % produjo inhibición total del crecimiento del tubo germinativo de *M. fructicola*.

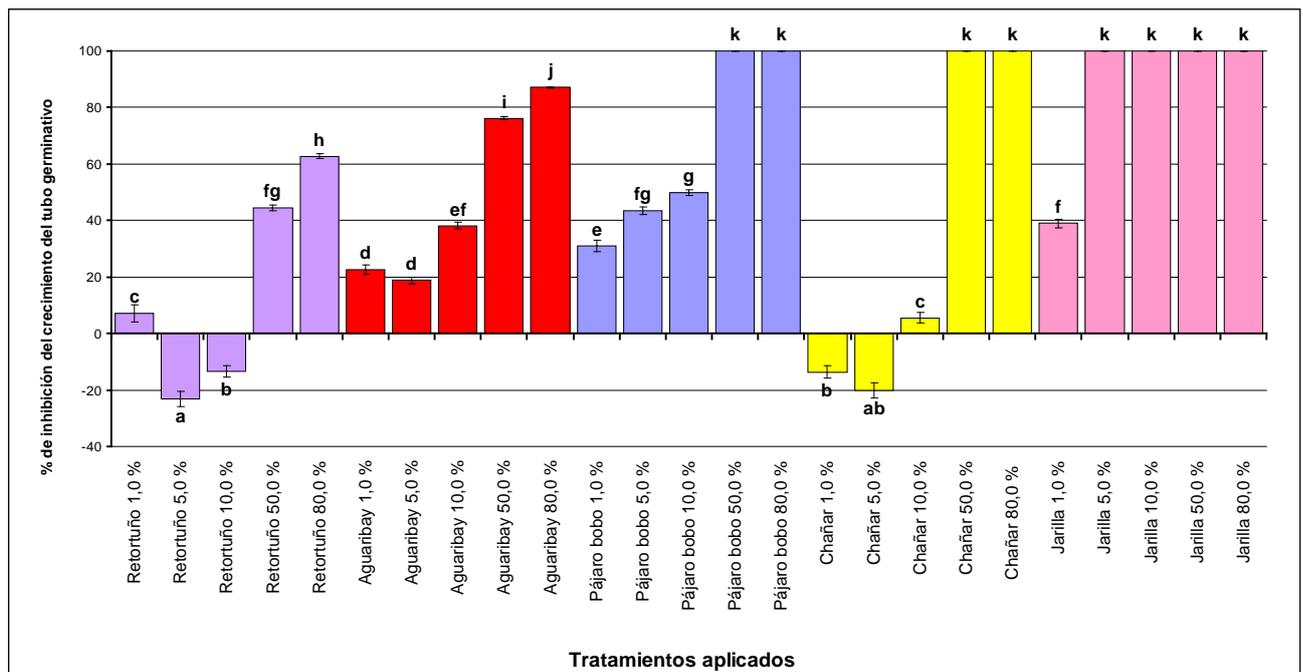


Figura V-2. Porcentaje medio de inhibición del crecimiento del tubo germinativo de conidios de *M. fructicola* tratados con extractos vegetales de retortuño, aguaribay, pájaro bobo, chañar y jarilla a las concentraciones de 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 y 80,0 %.

**Letras distintas indican diferencias significativas para test de Tukey ($p \leq 0,05$); la línea en el extremo de cada columna indica el error estándar.

V-1.3. Inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* tratados con extracto de jarilla.

El extracto de jarilla fue el más efectivo según los resultados obtenidos en los ensayos anteriores ya que, a una concentración del 5,0 % se obtuvo 100,0 % de inhibición. En base a ello se probaron concentraciones en un rango más estrecho de valores y se repitieron las anteriores para corroborar los datos obtenidos. Los resultados de esta prueba de inhibición pueden ser observados en la figura V-3.

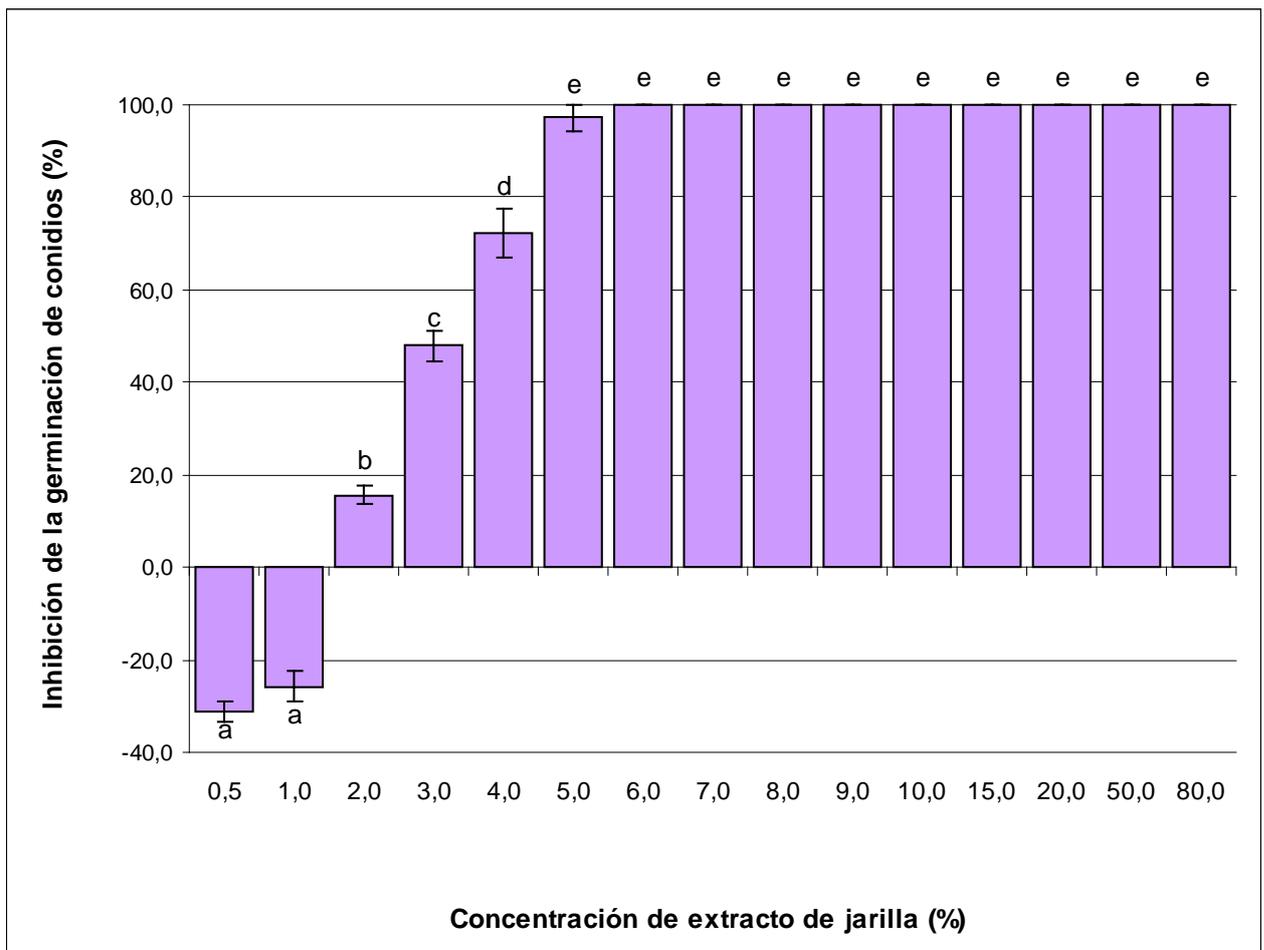


Figura V-3. Porcentaje medio de inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* tratados con el extracto de jarilla a distintas concentraciones.

**Letras distintas indican diferencias significativas para test de Tukey ($p \leq 0,05$); la línea en el extremo de cada columna indica el error estándar.

Para determinar la concentración de extracto de jarilla que inhibiría en un 50,0 y 95,0 % la germinación de conidios de *M. fructicola*, se utilizó el modelo de ajuste no lineal logístico con corrimiento. En el análisis se obtuvo un cuadrado medio del error (CME) de 9,9 %, un error estándar de 3,2 y R^2 (ajustada por g.l.) de 99,6 %. El modelo utilizado fue:

$$Y = \alpha / (1 + \beta^{(-\gamma^X)}) + \delta$$

En donde los parámetros de la función tomaron los siguientes valores:

Variable dependiente:

Y= % de inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola*

Variable independiente:

X= concentración de extracto de jarilla en %

Parámetros estimados:

$\alpha = 155,2$; $\beta = 10,4$; $\gamma = 1,0$; $\delta = -54,4$

En función de este modelo, se obtuvo que concentraciones de extracto de jarilla de 3,0 y 5,5 % inhibirían en un 50,0 y en un 95,0 % la germinación de conidios de *M. fructicola* respectivamente. A fin de obtener los límites del intervalo de confianza del valor pronosticado, para una probabilidad del 95,0 % de éxito, se hizo correr nuevamente el modelo ajustándolo por tanteo. Los resultados obtenidos permitieron validar el modelo propuesto, el cual se presenta en la figura V-4.

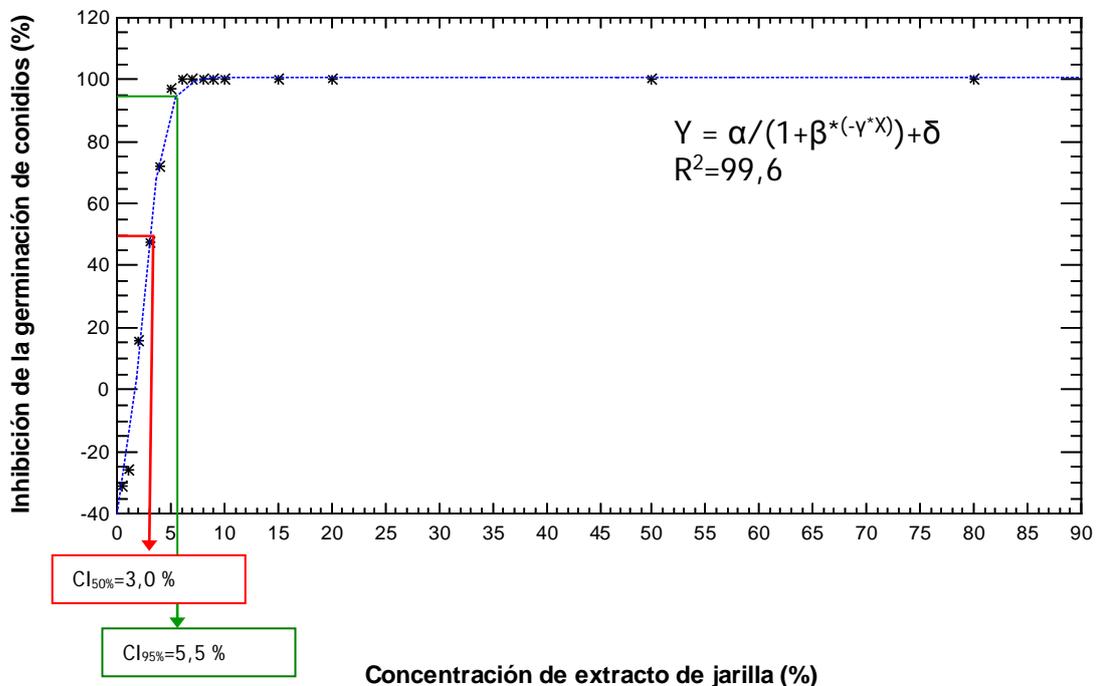


Figura V-4. Porcentaje medio de inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* en función de las distintas concentraciones del extracto de jarilla (*). La curva representa los valores esperados según el modelo de ajuste logístico propuesto (----).

V-1.4. Determinación de la cinética de inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* tratados con extracto de jarilla.

Los resultados obtenidos permitieron observar que, en el caso de la menor concentración objeto de estudio (10,0 %), el porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios del patógeno aumentó a medida que se incrementó el tiempo de contacto con el extracto vegetal. La inhibición en este caso tomó valores comprendidos entre el 41,0 y 94,0 % como puede observarse en la figura V-5. Cuando se emplearon los extractos a concentraciones superiores, 50,0 y 80,0 %, la inhibición de la germinación fue total aun al menor tiempo de contacto analizado.

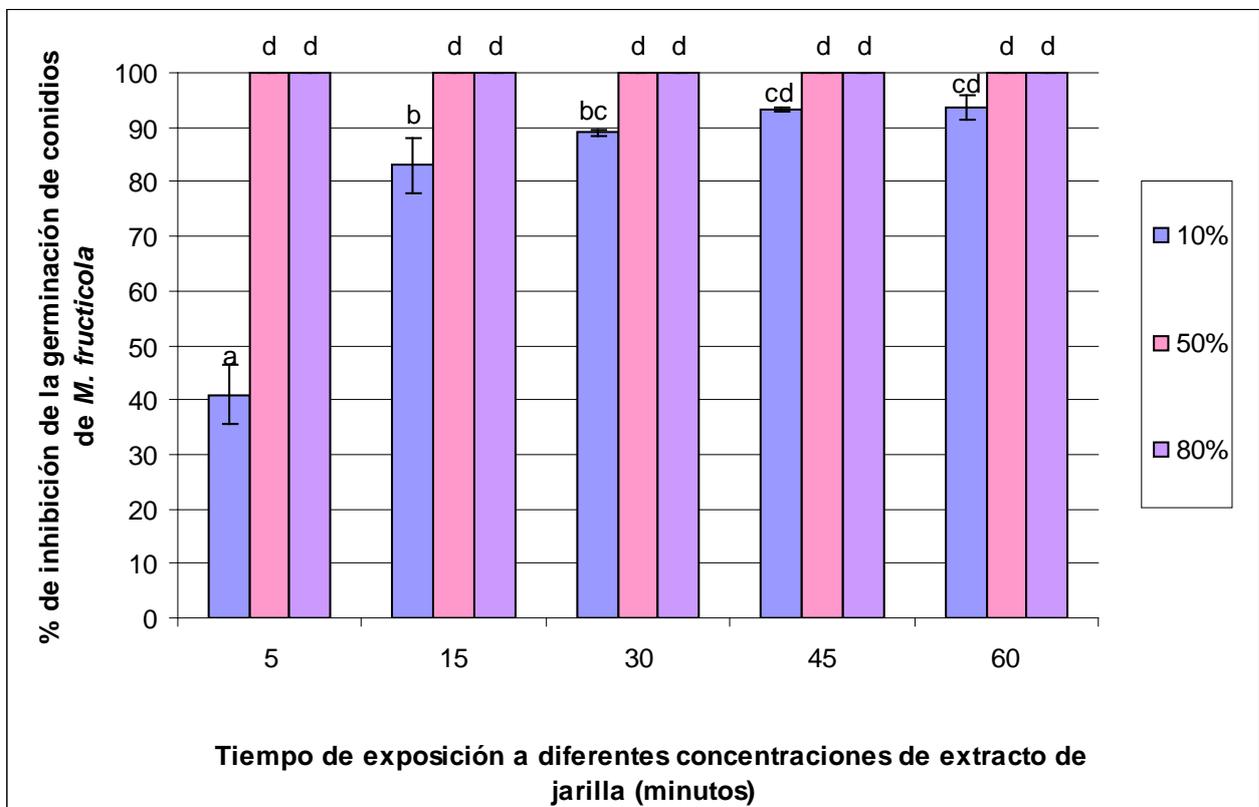


Figura V-5. Porcentaje medio de inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* tratados durante distintos tiempos de exposición (5 a 60 min.) con concentraciones crecientes del extracto de jarilla (10,0; 50,0 y 80,0 %)

**Letras distintas indican diferencias significativas para test de Tukey ($p \leq 0,05$); en el extremo de cada columna se indica el error estándar.

Para determinar el tiempo de contacto que inhibiría la germinación de conidios de *M. fructicola* en un 50,0 y 95,0 %, se realizó un análisis de regresión no lineal a fin de obtener un modelo apropiado de ajuste. El modelo seleccionado para una concentración del 10,0 % fue el monomolecular, el cual presentó un CME de 4,7 %, un

error estándar de 2,2 y R^2 (ajustada por g.l.) de 99,0 %. La función que representa el modelo es:

$$Y = \alpha * (1 - B * e^{(-\gamma * X)})$$

En donde los parámetros de la función tomaron los siguientes valores:

Variable dependiente:

Y= % de inhibición de germinación de conidios de *M. fructicola*

Variable independiente:

X= Tiempo de contacto en minutos de conidios de *M. fructicola* con extracto de jarilla al 10,0 %

Parámetros estimados:

$\alpha = 92,5$; $B = 1,3$; $\gamma = 0,2$

De acuerdo al modelo propuesto y al ajuste realizado por tanteo sólo fue posible calcular el tiempo de contacto necesario para inhibir en un 50,0 % la germinación de conidios del patógeno debido a que, el porcentaje de inhibición de la germinación se mantuvo estable a partir de los 120 minutos aproximadamente. En ese momento el valor de inhibición máximo logrado fue de 92,5 % (figura V-6).

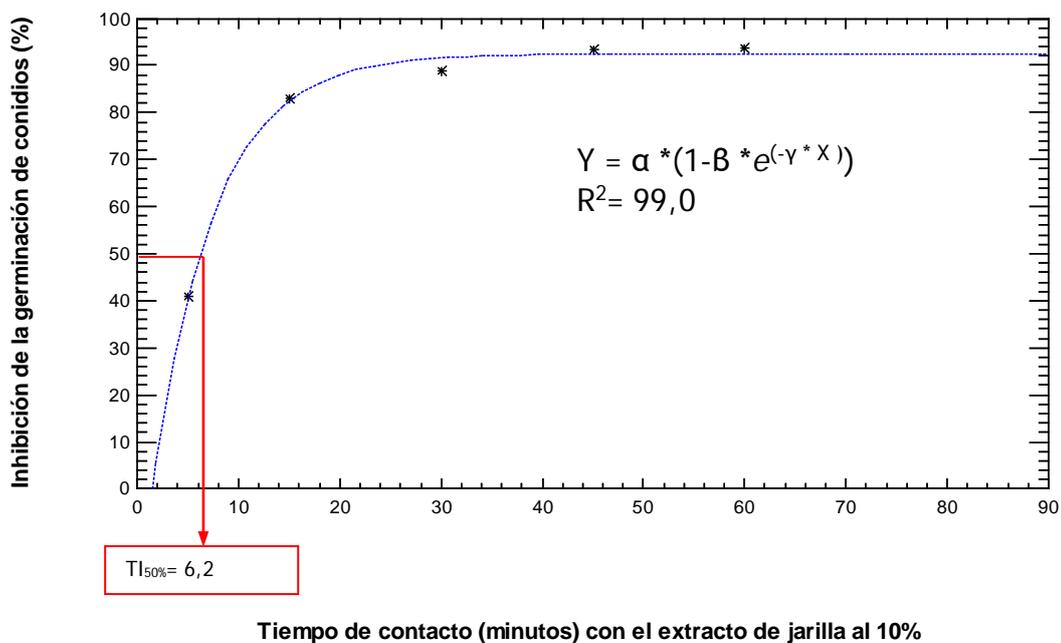


Figura V-6. Porcentaje medio de inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* tratados con extracto de jarilla al 10,0 % durante 5, 15, 30, 45 y 60 minutos. La curva (---) representa los valores esperados según el modelo Monomolecular ($R^2 = 99,0$).

V-1.5. Inhibición del crecimiento del tubo germinativo de conidios de *M. fructicola* tratados con extracto de jarilla a diversas concentraciones.

A partir de los resultados obtenidos se pudo observar que el extracto a las menores concentraciones estudiadas estimuló el crecimiento del tubo germinativo mientras que, a concentraciones mayores lo inhibió. Este último efecto se incrementó a medida que aumentó la concentración ensayada del extracto (figura V-7).

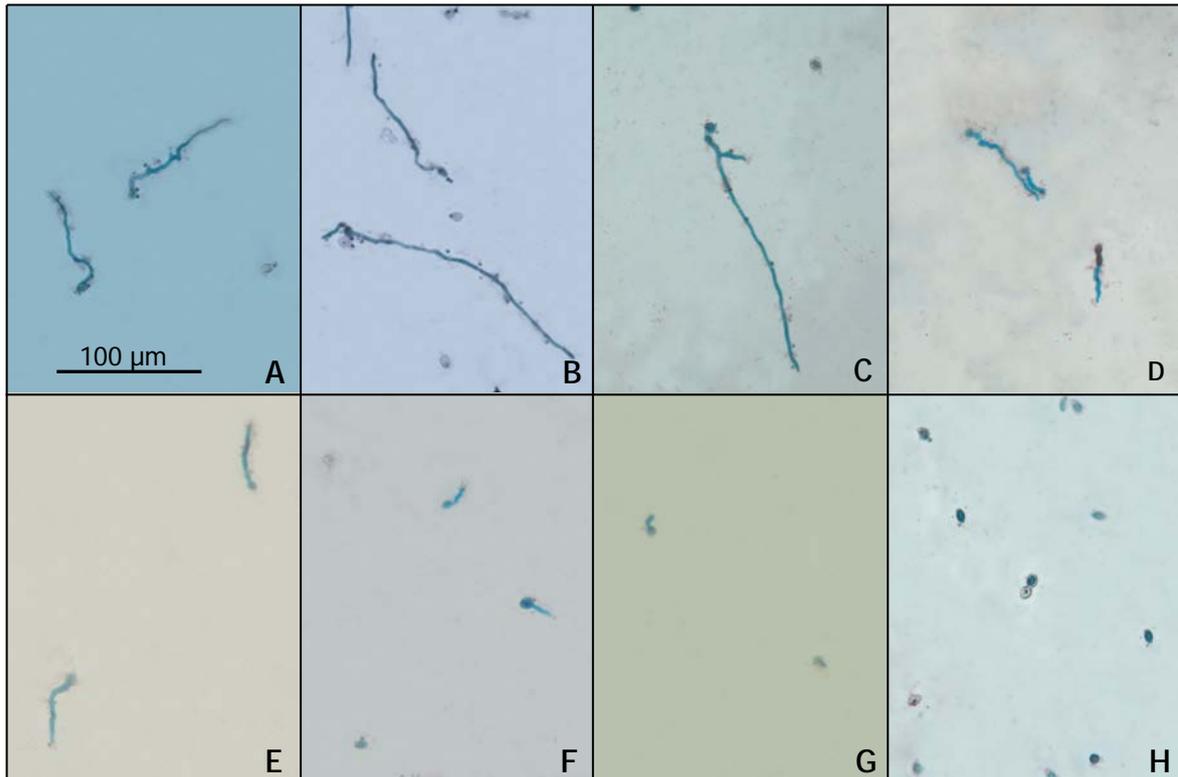


Figura V-7. Fotografías al microscopio óptico (320 x) de conidios y tubos germinativos de *M. fructicola* tratados con extracto de jarilla a distintas concentraciones. A-Testigo (solo agua), concentraciones creciente del extracto de jarilla B- 0,5 %, C- 1,0 %, D- 2,0 %, E- 3,0 %, F- 4,0 %, G- 5,0 %, H- Fotografía representativa de las concentraciones 6,0 al 80,0 %.

En detalle (figura V-8) pudo observarse que a las concentraciones de 0,5 y 1,0 % el crecimiento del tubo germinativo resultó estimulado alcanzando valores de 23,2 y 14,8 % respectivamente. Estos valores no se diferenciaron estadísticamente entre sí, pero sí del resto de las concentraciones ensayadas. Concentraciones superiores al 2 % inhibieron el crecimiento del tubo germinativo alcanzando valores de 8,6; 5,1 y 78,4 % para concentraciones del 2,0; 3,0 y 4,0 % respectivamente. Estos valores resultaron estadísticamente diferentes entre sí y respecto al resto de los valores obtenidos. Cuando la concentración del extracto fue igual o superior al 5 % la inhibición fue total, no existiendo diferencias significativas entre éstas últimas.

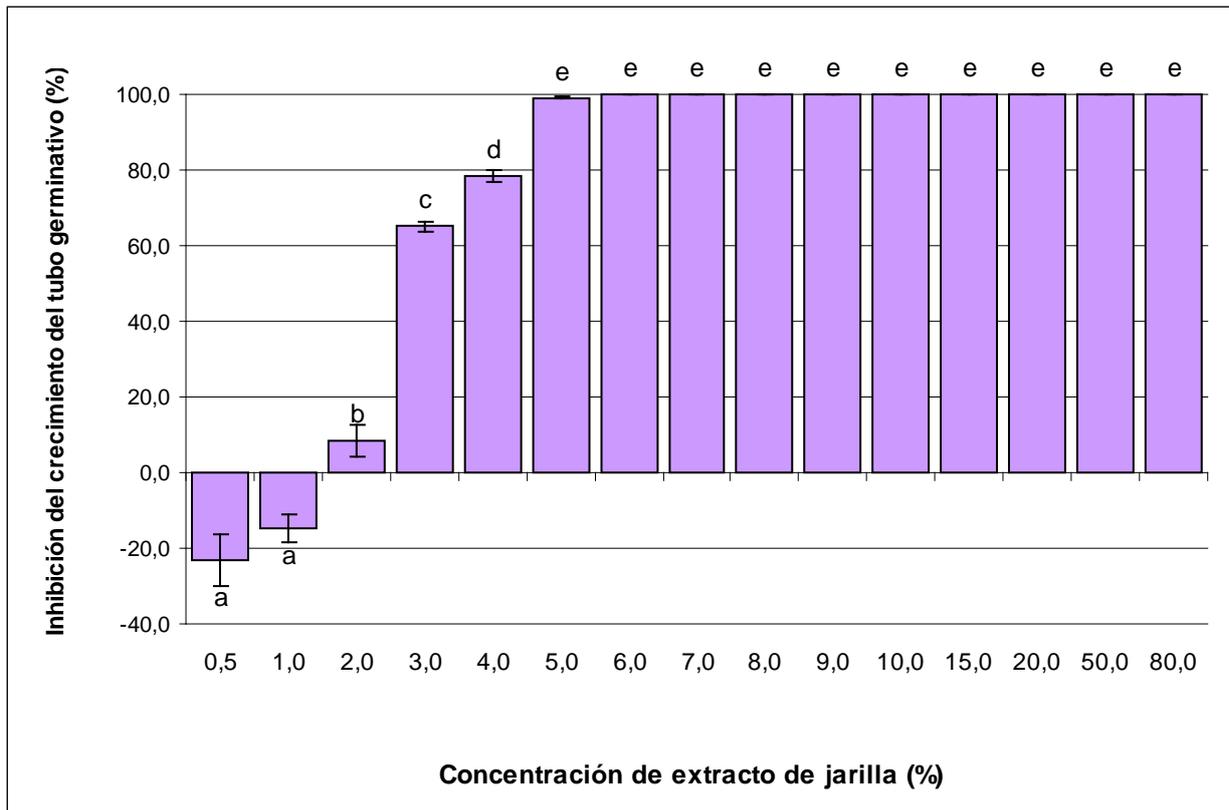


Figura V-8. Porcentaje medio de inhibición del crecimiento del tubo germinativo de conidios de *M. fructicola* tratados con extracto de jarilla a concentraciones crecientes entre 0,5 y 80,0 %.

**Letras distintas indican diferencias significativas para test de Tukey ($p \leq 0,05$); en el extremo de cada columna se indica el error estándar.

Para determinar la concentración de extracto de jarilla que inhibiría en un 50,0 y 95,0 % el crecimiento del tubo germinativo de conidios de *M. fructicola*, se realizó un análisis de regresión no lineal seleccionando el modelo Gompertz con corrimiento. Este modelo presentó un cuadrado medio del error (CME) de 12,0 %, un error estándar de 3,5 y R^2 (ajustada por g.l.) de 99,4 %. La función que representa el modelo es:

$$Y = \alpha * e^{(-B * e^{(-\gamma * X)})} + \delta$$

En donde los parámetros de la función tomaron los siguientes valores:

Variable dependiente:

Y= % de inhibición del crecimiento en largo de tubo germinativo de conidios de *M. fructicola*.

Variable independiente:

X= Concentración de extracto de jarilla en %

Parámetros estimados:

$\alpha = 120,4$; $B = 14,4$; $\gamma = 1,2$; $\delta = -20,3$

En función de este modelo, se obtuvo que concentraciones de extracto de jarilla de 2,8 y 4,9 % inhibirían en un 50,0 y en un 95,0 % el crecimiento en largo de tubo germinativo del patógeno respectivamente. A fin de obtener los límites del intervalo de confianza del valor pronosticado, para una probabilidad del 95,0 % de éxito, se hizo correr nuevamente el modelo ajustándolo por tanteo. Los resultados obtenidos permitieron validar el modelo propuesto, el cual puede ser observado en la figura V-9.

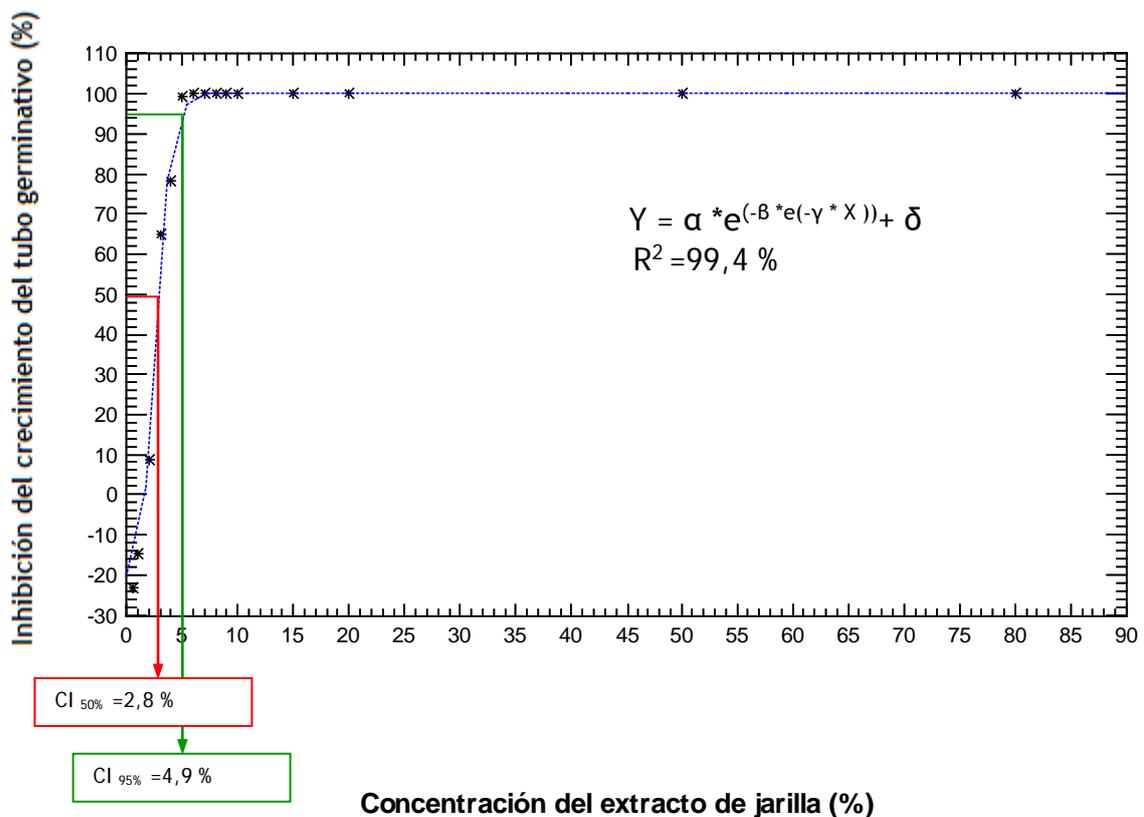


Figura V-9. Porcentaje medio de inhibición del crecimiento en largo de tubo germinativo de conidios de *M. fructicola* en función de distintas concentraciones (%) del extracto de jarilla (*). La curva (-) representa los valores esperados según el modelo de Gompertz ($R^2 = 99,4$).

V-1.6. Inhibición del crecimiento del micelio de *M. fructicola* en medio adicionado con extracto de jarilla a distintas concentraciones

Como resultado del estudio realizado se observó que el crecimiento del micelio del hongo resultó estimulado por el extracto de jarilla a las menores concentraciones analizadas. Sin embargo, a las más altas hubo inhibición (figura V-10).

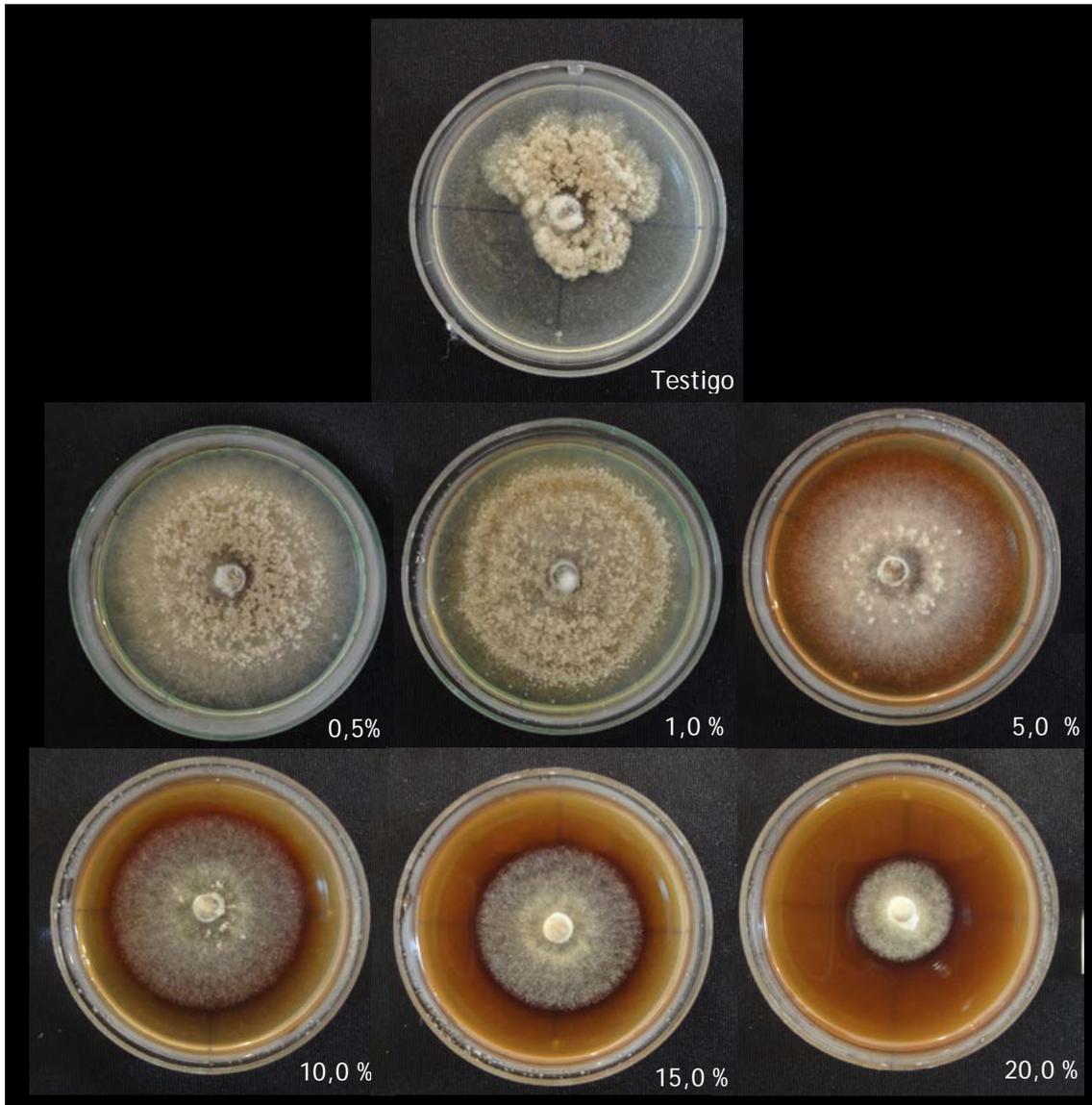


Figura V-10. Crecimiento del micelio de *M. fructicola* en medio adicionado con extracto de jarilla a diferentes concentraciones (0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 y 20,0 %).

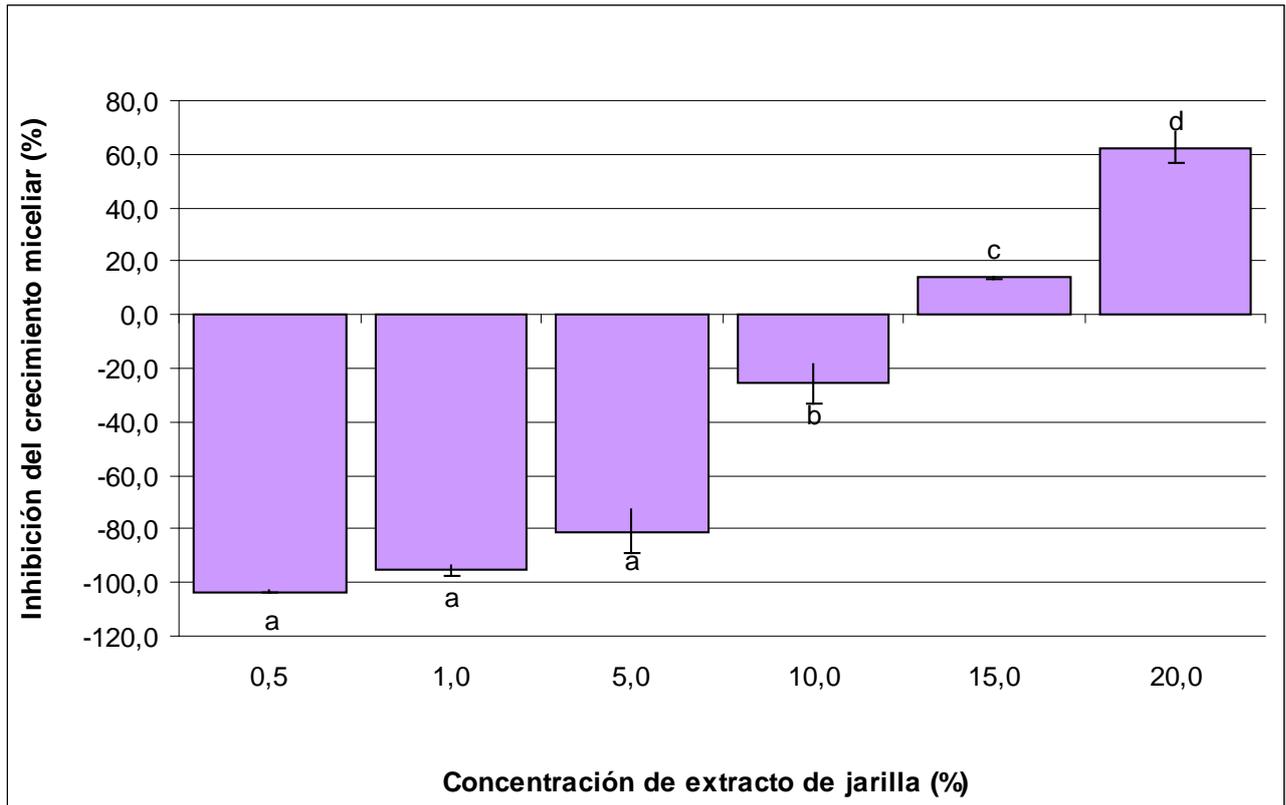


Figura V-11. Porcentaje medio de inhibición del crecimiento del micelio de *M. fructicola* en medio adicionado con extracto de jarilla a distintas concentraciones.

**Letras distintas indican diferencias significativas para test de Tukey ($p \leq 0,05$); en el extremo de cada columna se indica el error estándar.

Al observar con detenimiento los resultados obtenidos pudo notarse que concentraciones de 0,5; 1,0; 5,0 y 10,0 % de extracto estimularon el crecimiento del micelio. A su vez, a medida que aumentó la concentración disminuyó el efecto de estimulación. Por el contrario, concentraciones de 15,0 y 20,0 % inhibieron el crecimiento del micelio. En todos los casos pudo verificarse que a mayor concentración mayor inhibición (figura V-11).

Para determinar la concentración de extracto de jarilla que inhibiría en un 50 y 95% el crecimiento del micelio de *M. fructicola*, se realizó un análisis de regresión no lineal seleccionando el modelo Gompertz con corrimiento. Este modelo presentó un cuadrado medio del error (CME) de 48,1 %, un error estándar de 6,9 y R^2 (ajustada por g.l.) de 98,9 %. La función que representa el modelo es:

$$Y = \alpha * e^{(-B * e^{(-\gamma * X)})} + \delta$$

En donde los parámetros de la función tomaron los siguientes valores:

Variable dependiente:

Y= % de inhibición del crecimiento del micelio de *M. fructicola*

Variable independiente:

X= Concentración de extracto de jarilla en %

Parámetros estimados:

$\alpha = 260,3$; $B = 3,4$; $\gamma = 0,11$; $\delta = -111,9$

En función de este modelo, se obtuvo que concentraciones de extracto de jarilla de 18,6 y 25,5 % inhibirían en un 50,0 y en un 95,0 % el crecimiento del micelio de *M. fructicola* respectivamente. A fin de obtener los límites del intervalo de confianza del valor pronosticado, para una probabilidad del 95,0 % de éxito, se hizo correr nuevamente el modelo ajustándolo por tanteo. Los resultados obtenidos permitieron validar el modelo propuesto, el cual se presenta en la figura V-12.

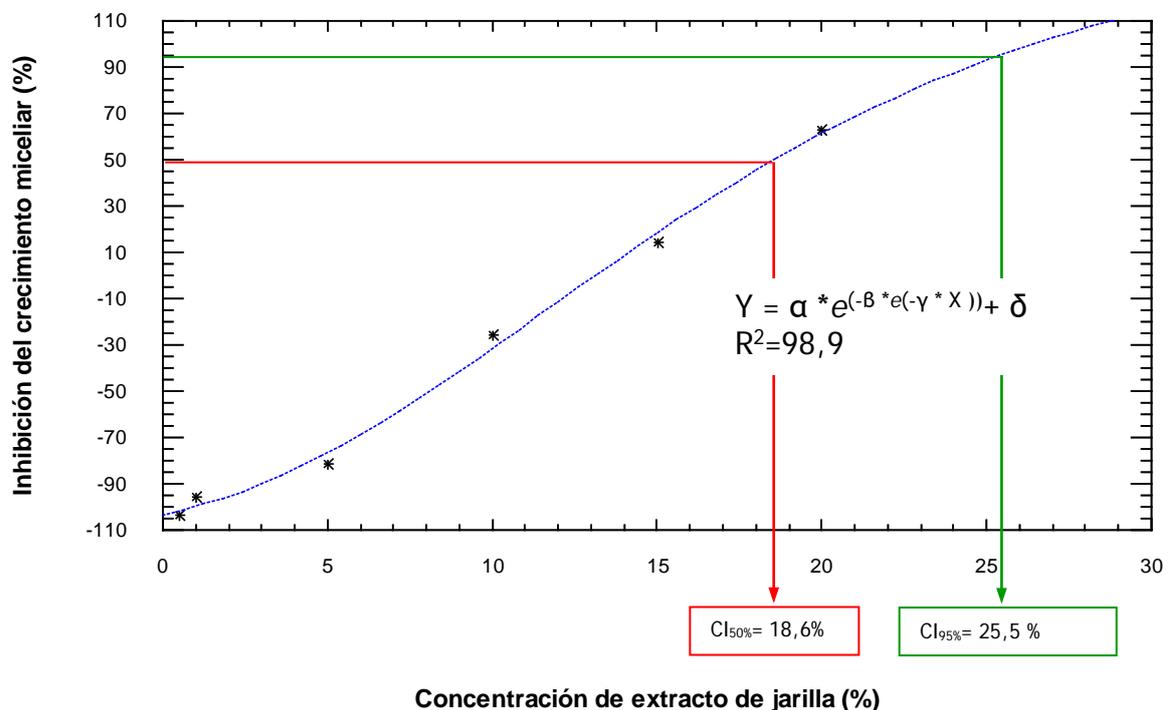


Figura V-12. Variación del porcentaje medio de inhibición del crecimiento del micelio de *M. fructicola* en función de distintas concentraciones (%) de extracto de jarilla (*). La curva (--) representa los valores esperados según el modelo de Gompertz ($R^2 = 98,9$).

V-1.7. Determinación del efecto de los compuestos volátiles presentes en el extracto acuoso de jarilla sobre el crecimiento del micelio de *M. fructicola*.

Como puede observarse en la figura V-13, los compuestos volátiles presentes en el extracto de jarilla a la menor concentración analizada estimularon el crecimiento del micelio mientras que, a mayores concentraciones lo inhibieron.

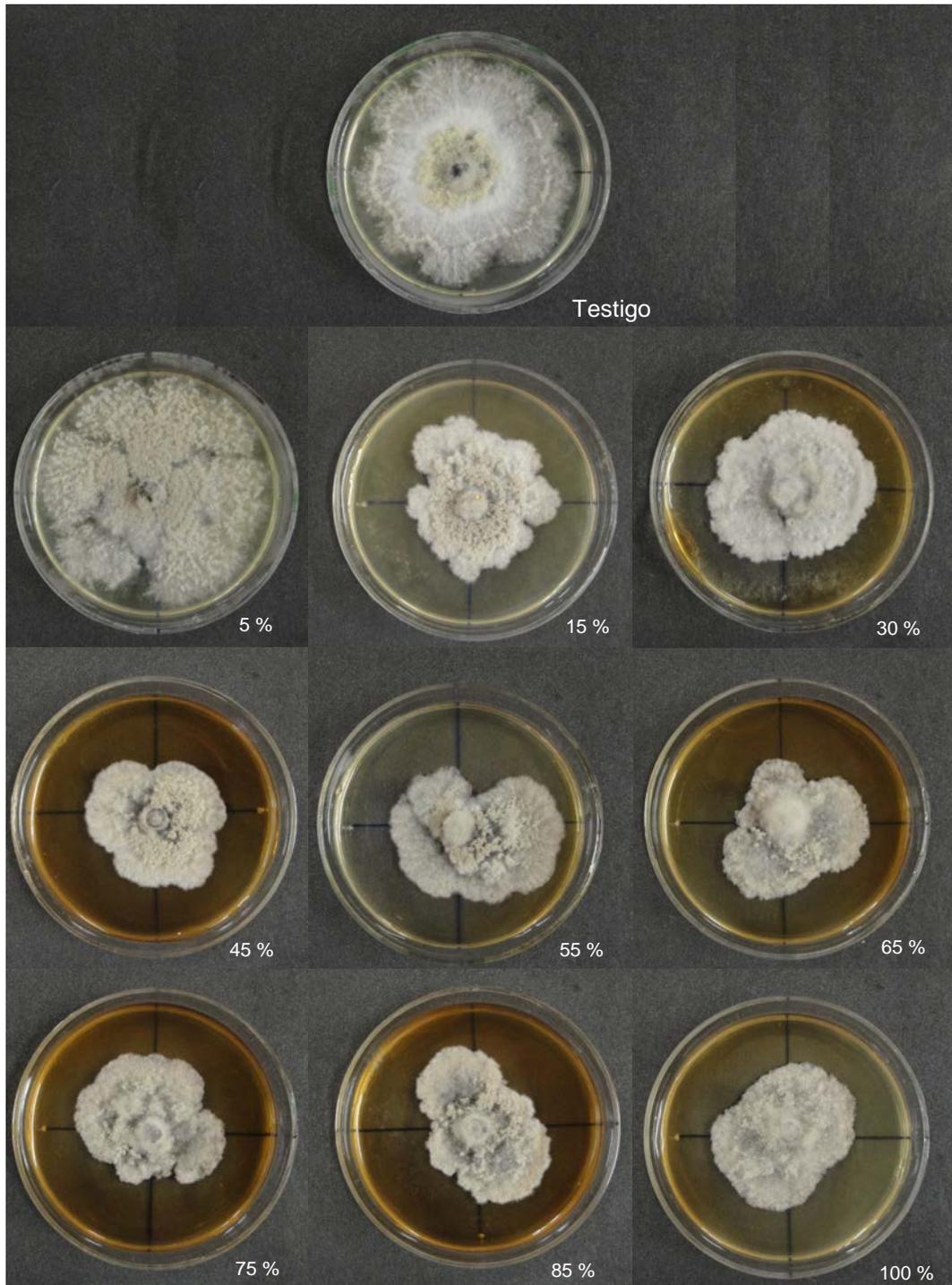


Figura V-13. Crecimiento del micelio de *M. fructicola* sometido a la acción de los compuestos volátiles presentes en el extracto de jarilla a distintas concentraciones (5,0; 10,0; 15,0; 30,0; 45,0; 55,0; 65,0; 75,0; 85,0 y 100,0 %).

Como puede observarse en la figura V-14, la estimulación del crecimiento del micelio se observó cuando el extracto fue empleado al 5,0 %, mientras que, a concentraciones superiores provocó un efecto inhibitorio. Cuando la concentración del extracto estuvo comprendida entre valores del 15,0 y 100,0 %, el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio se mantuvo entre valores del 44,0 y 63,0 %. Del análisis estadístico de estos datos surgió que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos que ocasionaron la inhibición del crecimiento, solamente se distinguió aquel que demostró estimularlo.

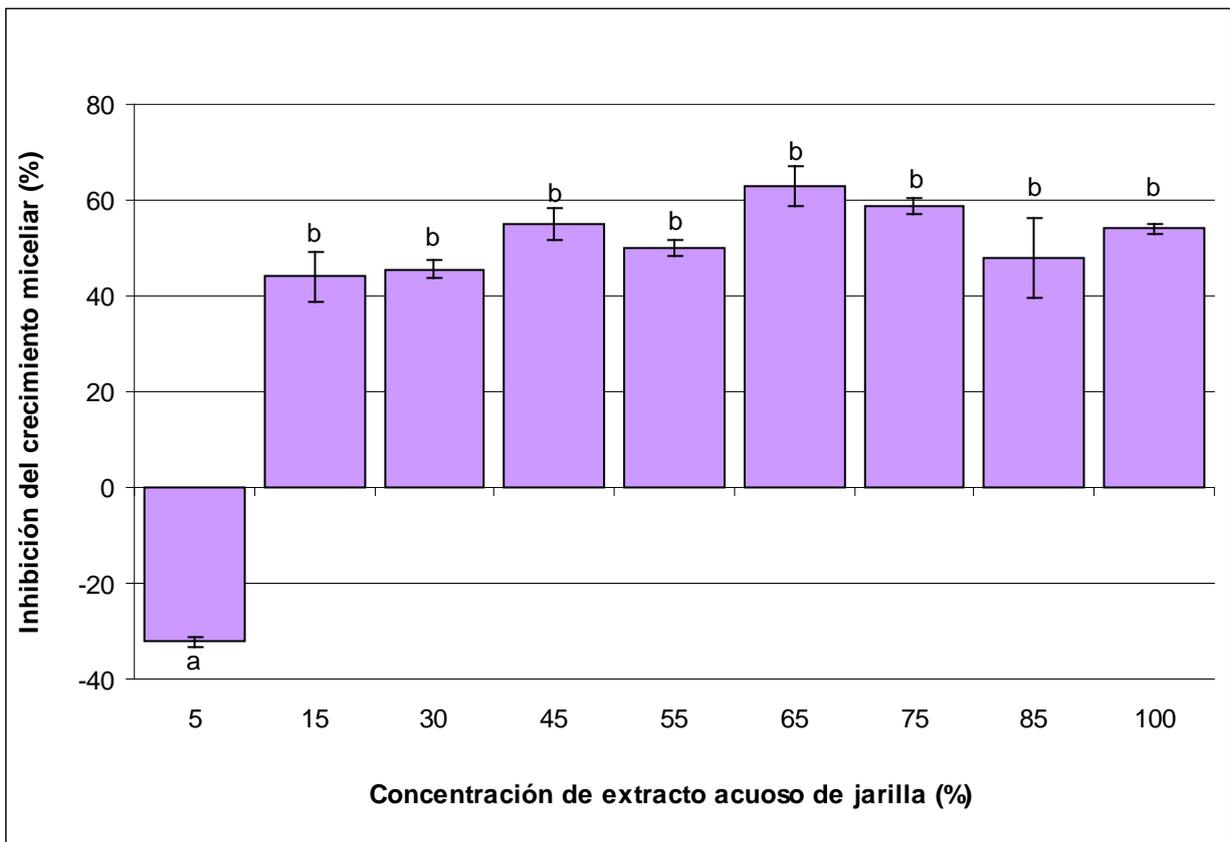


Figura V-14. Porcentaje medio de inhibición del crecimiento del micelio de *M. fructicola* sometido a la acción de los compuestos volátiles presentes en el extracto de jarilla a distintas concentraciones (5,0; 10,0; 15,0; 30,0; 45,0; 55,0; 65,0; 75,0; 85,0 y 100,0 %).

**Letras distintas indican diferencias significativas para test de Tukey ($p \leq 0,05$); en el extremo de cada columna se indica el error estándar.

Para determinar el porcentaje del extracto de jarilla que inhibiera, por efecto de las sustancias volátiles presentes en él, el crecimiento del micelio del patógeno en un 50 y 95%, se realizó un análisis de regresión no lineal. De este estudio surgió que el modelo que mejor se adaptó a los datos fue el de Gompertz con corrimiento, el cual presentó un CME de 43,8 un error estándar de 6,6 y R^2 (ajustada por g.l.) de 94,7 %. La función que representa el modelo es:

$$Y = \alpha * e^{(-B * e^{(-\gamma * X)})} + \delta$$

En donde los parámetros de la función tomaron los siguientes valores:

Variable dependiente:

Y= % de inhibición del crecimiento del micelio de *M. fructicola*

Variable independiente:

X= Concentración de extracto de jarilla (%)

Parámetros estimados:

$\alpha = 167,3$; $\beta = 2,4$; $\gamma = 0,2$; $\delta = -113,7$

De acuerdo al modelo propuesto (figura V-15) y al ajuste realizado por tanteo sólo fue posible calcular el volumen de extracto de jarilla necesario para inhibir en un 50 % el crecimiento micelial de *M. fructicola*, dado que a partir de una concentración del 65 %, la inhibición se mantuvo estable en un valor del 54 %.

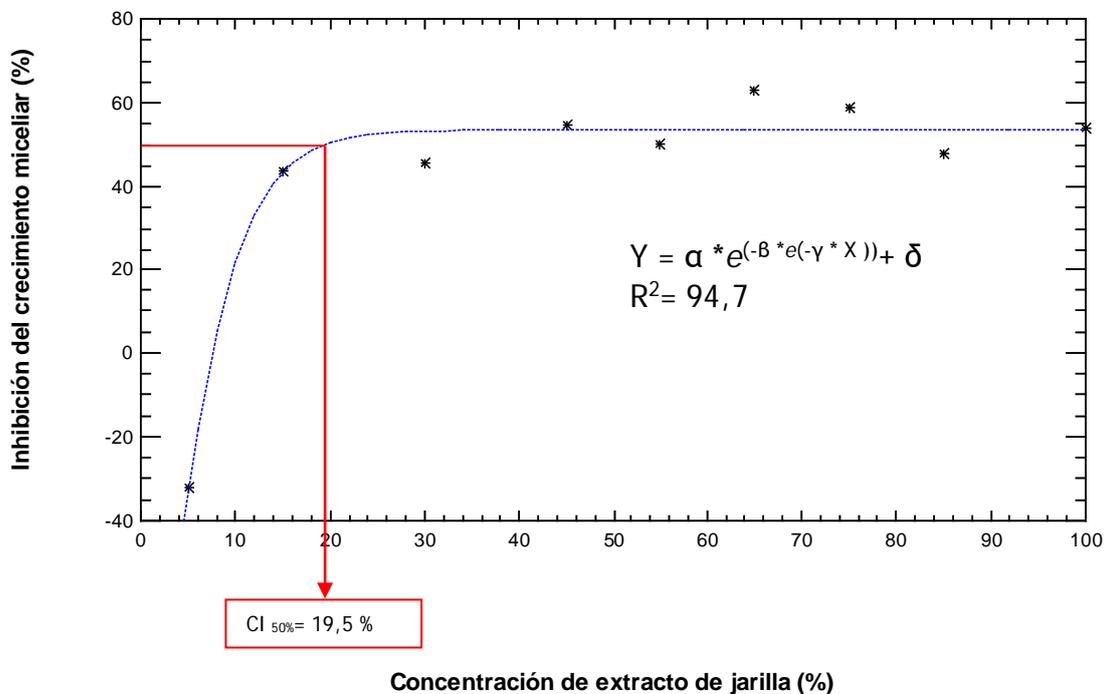


Figura V-15. Porcentaje medio de inhibición del crecimiento del micelio de *M. fructicola* en función de distintas concentraciones (%) del extracto de jarilla (*). La curva (--) representa los valores esperados según el modelo de Gompertz ($R^2 = 94,7$).

VI- DISCUSIÓN

Según ha podido observarse en los distintos ensayos realizados, en lo referente a la capacidad de inhibición de los extractos de retortuño, aguaribay, pájaro bobo, chañar y jarilla, existe un comportamiento diferente según se analice su actividad sobre la germinación o el crecimiento del tubo germinativo de *M. fructicola*. En lo referente a la germinación se pudo observar que los tratamientos con retortuño y aguaribay al 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 y 80,0 %, pájaro bobo y chañar al 1,0; 5,0 y 10,0 % y jarilla al 1,0 % provocaron una inhibición de la germinación de los conidios entre 0,0 y 18,0 %, mientras que el resto de los tratamientos inhibió totalmente la germinación. Estudios realizado por Boiteux en el 2011 demostraron que, a diferencia de éstos, el extracto acuoso de chañar, obtenido con el mismo procedimiento, recién demostró un efecto inhibitor de la germinación de los conidios de *Botrytis cinerea* a partir del 50,0%.

Por otro lado, cuando se analizó el efecto sobre el crecimiento del tubo germinativo de *M. fructicola*, se observó que no resultó afectado por los extractos de retortuño y chañar a las menores concentraciones, incluso en algunos casos lo estimularon. A pesar de esto, a las concentraciones mayores, si demostraron un válido efecto inhibitor. El extracto de pájaro bobo inhibió completamente el crecimiento de tubo germinativo a las concentraciones mayores. Por otro lado el extracto de jarilla fue el más efectivo, ya que a partir del 5,0% inhibió totalmente el crecimiento del tubo germinativo de los conidios de *M. fructicola*. En el caso de los extractos de aguaribay, pájaro bobo y jarilla, a medida que se incrementó la concentración del extracto aumentó el efecto de inhibición sobre el crecimiento del tubo germinativo. Un efecto similar al observado en esta tesis fue reportado por Boiteux en 2011 sobre *B. cinerea* en trabajos con extracto acuoso de chañar. Además, en esos estudios la autora observó que la capacidad de inhibición se incrementó a medida que aumentó la concentración del extracto.

Gatto y colaboradores (2011) en sus ensayos evaluaron la actividad *in vitro* e *in vivo* de los extractos obtenidos a partir de nueve especies silvestres de plantas herbáceas comestibles contra algunos hongos patógenos de poscosecha importantes, entre ellos *Monilinia laxa*. Todos los extractos mostraron en menor o mayor medida inhibición de la germinación de los conidios, en particular, el de *Sanguisorba minor* el cual, inhibió completamente a *M. laxa*. En general, muchos de los extractos analizados por Gatto *et al.* 2011 mostraron una mayor capacidad de inhibir el crecimiento del tubo germinativo que la germinación de los conidios, al igual que en este estudio. Otros aspectos analizados por los autores mencionados les permitieron concluir que, la germinación de conidios de los diferentes hongos incubados con los

extractos de *Sanguisorba minor*, *Orobancha crenata*, *Borago officinalis*, *Plantago lanceolata*, y *Plantago coronopus*, mostraron malformaciones del tubo germinativo, desorganización de la pared celular y fugas de material citoplasmático de las hifas. Este comportamiento sugiere un envenenamiento progresivo del tubo germinativo causado por algunos compuestos "tóxicos" presentes en los extractos. Las pruebas *in vivo* confirmaron la alta eficacia mostrada *in vitro* por el extracto *S. minor*. En nuestros ensayos en los tratamientos con los extractos de aguaribay, pájaro bobo y retortuño se observó la presencia de dos tubos germinativos por conidio.

En los estudios de cinética de inhibición se observó que el extracto acuoso de jarilla al 10,0 %, inhibió la germinación de los conidios. Se notó que a medida que aumentó el tiempo de contacto, aumentó el porcentaje de inhibición, desde 41,0 a 94,0 % aproximadamente. Por otro lado, según el modelo de ajuste propuesto sólo son necesarios 6,2 minutos de contacto con el extracto para inhibir en un 50,0 % la germinación de conidios. A pesar de ello, no fue posible calcular el tiempo de contacto necesario para que el extracto de jarilla al 10,0%, inhibiera en un 95,0 % la germinación de conidios de *M. fructicola* debido a que, el porcentaje de inhibición de la germinación se mantuvo estable en 92,5 % a partir de los 120 minutos aproximadamente. Con respecto a la cinética de inhibición de los extractos a las concentraciones de 50,0 y 80,0 % se observó que, ya a los 5 minutos de contacto del producto con los conidios del patógeno la inhibición fue total. Desde un punto de vista tecnológico, la determinación del tiempo mínimo de contacto (extracto-conidio) necesario para inhibir la germinación de conidios de *M. fructicola* resulta útil, ya que permitiría utilizar el extracto como coadyuvante de elaboración más que como un aditivo alimentario. De esta manera el contacto del producto con el extracto se reduciría a períodos limitados de tiempo, suficientes para alcanzar niveles aceptables de inhibición fúngica. Permitiendo la posterior eliminación del extracto mediante técnicas adecuadas tales como el lavado, volatilización, etc. Así, probablemente se reducirían las posibles alteraciones organolépticas y fisicoquímicas causadas en el producto tratado. No obstante, cabe señalar que en este trabajo se utilizaron técnicas *in vitro*, siendo necesario realizar posteriores pruebas de cinética de inhibición mediante técnicas *in vivo*.

Con respecto al efecto de los extractos sobre el crecimiento del micelio de *M. fructicola* los resultados son diversos. En este caso concentraciones de 0,5; 1,0; 5,0 y 10,0 % de extracto de *L. divaricata* estimularon el crecimiento micelial, sin embargo a medida que aumentó la concentración disminuyó el efecto de estimulación demostrando, un efecto inhibitor a valores de 15,0 y 20,0 %. Estos resultados permitirían generar al menos dos hipótesis, una de ellas haría referencia a que la o las sustancias tóxicas presentes en el extracto sólo serían efectivas a elevadas concentraciones y que la presencia de otros compuestos en el extracto estimularían el

.....

crecimiento del micelio. Una segunda hipótesis permitiría suponer que las sustancias presentes en el extracto a bajas concentraciones actuarían como promotoras del crecimiento mientras que, tendrían un efecto tóxico en cantidades superiores. Podría avanzarse a este respecto realizando separaciones de fracciones de compuestos a través de técnicas químicas como son la cromatografía líquida de alta presión entre otras, de modo de, posteriormente, probar la actividad biológica de los compuestos por separado.

Existen varios autores que han estudiado el comportamiento de extractos de *Larrea* sp. sobre el crecimiento micelial de diversos hongos fitopatógenos. Entre ellos Tequida-Meneses y colaboradores (2002), evaluaron la actividad fungicida de plantas silvestres entre ellas *Larrea* sp. sobre seis especies de hongos y demostraron que el extracto de esta última inhibió el crecimiento micelial de las seis especies de hongos en un rango de 41,5 hasta el 100,0 %. En este caso, los autores utilizaron extractos metanólicos y etanólicos a diferencia de los acuosos estudiados en esta tesis. Castillo *et al.*, 2010, comprobaron una inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn por efecto del extracto de *Larrea* sp. y confirmaron que esta especie vegetal presente en las regiones semiáridas de México tienen altos contenidos de taninos y un pool de desconocidos fitoquímicos con potencial antimicrobiano, para ser usado contra hongos patógenos. Quiroga *et al.*, 2004, en sus ensayos comprobaron que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Larrea divaricata* inhibió entre el 41,3 y 77,6 % el crecimiento micelial de varias especies de hongos. Por otra parte, estudios realizados por Feliziani *et al.*, 2013, sobre otra especie de este mismo género de patógeno, *M. laxa*, concluyeron que el extracto de *Urtica dioica* produjo una inhibición significativa del crecimiento micelial.

Respecto al estudio realizado sobre los compuestos volátiles presentes en el extracto de jarilla se observó, que a bajas concentraciones el extracto estimuló el crecimiento micelial de *M. fructicola*, mientras que, a concentraciones elevadas lo inhibió en valores que oscilan el 44,0 y 63,0 % aproximadamente. Estos resultados son comparables con los del ensayo de terreno envenenado donde, a las concentraciones más bajas se observó estimulación del crecimiento.

VII- CONCLUSIONES

Todos los extractos estudiados presentaron en menor o mayor medida un efecto inhibitorio sobre la germinación y el crecimiento de tubo germinativo de conidios de *M. fructicola*. El extracto de jarilla (*L. divaricata*) fue el más efectivo a las concentraciones estudiadas registrándose, un efecto dosis-dependiente, es decir que a mayor concentración de extracto mayor fue el porcentaje de inhibición de las variables mencionadas.

Mediante la técnica de cinética de inhibición de la germinación de conidios de *M. fructicola* se determinó que el porcentaje de inhibición de la germinación aumentó en relación al incremento de la concentración de extracto y del tiempo de exposición con esta sustancia. Es decir, que a mayor concentración de extracto, mayor fue el porcentaje de inhibición de la germinación, siendo ésta aún mayor a mayores tiempos de exposición. Estos resultados coinciden con los logrados en el ensayo de inhibición de la germinación y largo de tubo germinativo, donde el porcentaje de inhibición es también dependiente de la concentración del extracto.

Con la técnica de terreno envenenado, se logró determinar que el crecimiento miceliar de *M. fructicola* es estimulado con bajas concentraciones de extracto de jarilla e inhibido por aquellas altas.

En los estudios de las fases volátiles del extracto de jarilla sobre la inhibición del crecimiento miceliar de *M. fructicola* se pudo determinar que, en concordancia con el crecimiento del micelio en un terreno envenenado con el extracto vegetal, bajas concentraciones de extracto estimulan el crecimiento miceliar del hongo. Por otro lado, concentraciones elevadas del extracto producen una inhibición efectiva del crecimiento miceliar del hongo.

Por todo lo mencionado anteriormente, podría decirse que el extracto de jarilla permite inhibir al hongo *M. fructicola in vitro*. Estos estudios indicarían que el extracto acuoso de este último vegetal podría potencialmente ser usado para el manejo de *M. fructicola* en poscosecha. Sin embargo, para este fin, se requieren estudios ulteriores *in vivo* además de ensayos específicos que permitan determinar las concentraciones óptimas, tiempo de exposición y calidad sensorial de las frutas tratadas. Esto último consentiría lograr mayor eficacia de control con una mínima o nula alteración de las características organolépticas del producto sobre el cual sea aplicado.

Estos estudios sientan las bases biológicas de próximas investigaciones en las cuales podrían ser separados los diferentes grupos de compuestos constituyentes de estos extractos, con el objetivo de ver cuáles de ellos son los principales responsables

de la actividad antifúngica, en qué concentración se encuentra en la planta y cuál es la concentración efectiva para su aplicación. Este hecho abre la posibilidad de que estos metabolitos puedan ser utilizados como principios activos en la formulación de bioplaguicidas.

VIII- BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ABOU-JAWDAH, Y.; SOBH, H. y SALARNET, A. 2002. "Antymicotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi". J. Agric. Food Chem. 50: 3208-3213.
- AGRIOS, G.N. 2005. Plant pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. 922 pag. ISBN 0-12-044565-4
- ALCALÁ DE MARCANO, D.; VARGAS, N. y PIRE A. 2005. "Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*". Rev. Fac. Agron. (LUZ), 22: 315-323.
- AMORIM, A.C.L.; CARDOSO, M. das G.; PINTO, J.E.B.P.; SOUZA, P.E. y FILHO, N.D. 2004. "Fungitoxic activity avaluation of the hexane and methanol extracts of copaiba plant leaves *Copaifera langsdorffi* Desfon". Ciência e Agrotecnologia 28(2): 316-324.
- BAÑOS, P. E.; ZAVALA, E. M.; COLINAS, M. T.; LUNA, I. R. y GUTIÉRREZ, J. A. 2004. "Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya Maradol Roja (*Carioca papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados". Rev. Mex. Fitopatol. 22: 198-205.
- BARBOZA, G. E.; CANTERO, J.J.; NUÑEZ, C.O. y ARIZA ESPINAR, L. 2006. Flora medicinal de la provincia de Córdoba (Argentina). Pteridófitas y antofitas silvestres o naturalizadas. 472-473, 742, 1169-1171
- BAUTISTA, S.; BARRERA L. N.; BRAVO L. L.; BERMÚDEZ, K. T. 2002. "Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidente of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruits after storage". Rev. Mex. Fitopatol. 20: 8-12.
- BAUTISTA S.; GARCÍA E. D.; BARRERA L. N.; REYES R. C. y WILSON C. L. 2003. "Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit". Postharv. Biol. Technol. 29: 81-92.
- BAUTISTA S.; HERNÁNDEZ M. L. y BOSQUEZ E. M. 2004 a. "Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts". Rev. Mex. Fitopatol. 22: 178-186.
- BAUTISTA S.; DE LUCCA A. y WILSON C. L. 2004 b. "Evaluation of the antifungal activity of natural compounds to reduce postharvest blue mould (*Penicillium*

-
- expansum* Link.) of apples (*Malus domestica* Borkh.) during storage". Rev. Mex. Fitopatol. 22: 362-369.
- BERNAL A.; ZAMORA N. J. F.; VIRGEN G. C. y NUÑO R. 2005. "Actividad biológica in vitro de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos". Rev. Mex. Fitopatol. 23: 140-146.
- BOITEUX J. J. 2011. "Efecto del extracto acuoso de *Geoffroea decorticans* (chañar) sobre *Botrytis cinerea*, como posible alternativa para su control, en poscosecha de uva de mesa". Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza-Argentina.
- BOYRAZ N. y OZCAN M. 2006. "Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey". International Journal of Food Microbiology 107: 238-242.
- BUSS, E.A.; PARK-BROWN, S.G. 2002. Natural products for insect pest management (on line). Florida, US, UF/IFAS. Consultado 18 Set. 2009. Disponible en <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN19700.pdf>
- CARL ZEISS VISION GMBH. 2006. Axionvision version 3.0.6.1
- CASTILLO F.; HERNÁNDEZ D.; GALLEGOS G.; MENDEZ M.; RODRÍGUEZ R.; REYES A., AGUILAR C.N. 2010. *In Vitro* antifungal activity of the plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. Industrial Crops and Products 32:324-328.
- CHILOSI G., CARUSO C., CAPORALE C., LEONARDI L., BERTINI L., BUZI A., NOVILE M., MAGRO P. y BUONOCORE V. 2000. "Antifungal activity of a Bowman Birk-type Trypsin inhibitor from Wheat Kernel" Journal Phitopathology 148:477-481.
- COSTA MAURO J.N.; CAMPOS V.P.; OLIVEIRA D.F. y PFENNING L.H. 2001. "Toxicidad de extratosvegetais e de estorcós a *Meloidogyne incógnita*". Summa. Phytopathologica. 27 (2): 245-250.
- CREMER, C. Y GIAYETTO, A. 2005. Extractos vegetales: posibles usos como agentes de control de plagas y enfermedades. Fruticultura y diversificación, 46: 37-39.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). In Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. eds. Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, US, American Society of Plant Physiologists. p. 1250-1318.
- CRUZ DE MATOS, O. 2000. "Uso de sustancias naturais de origen vegetal com actividade biológico na proteccao das cultural agrícolas". Agronomía Lusitana. 48 (Suplemento 2) 1-44.

- DAVICINO, R. MATTAR, M.A., CASALI, Y.A., CORREA, S.G., PETTENATI, E.M. y MICALIZZI, B. 2007. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. Rev. Peru. Biol. 14(2):247-251. ISSN (Versión electrónica) 1727-9933.
- DAVICINO, R., MARTINO, R. y ANESINI, C. 2011. *Larrea divaricata* Cav.: Scientific evidence showing its beneficial effects and its wide potential application. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica Chile. 10(2): 92-103. ISSN (Versión electrónica): 0717-7917
- DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- EYNARD C. y GALETTO L. 2002. "Pollination ecology of *Geoffroea decorticans* (Fabaceae) in central Argentine dry forest". Journal of Arid Environments 51: 79-88.
- FELIZIANI, E., SANTINI, M., LANDI, L., ROMANAZZI G. 2013. Pre- and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. Postharvest Biology and Technology 78: 133-138
- FERGET, G. 1994. "Hidrolatos de plantas cultivadas biológicamente y su utilización en la producción de cultivos: una forma innovadora de manejo agrícola". Santa Fé de Bogotá. 302 p.
- FERREIRA, J.C.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; MIRANDA, J.C.; BARRETO, S.S. 2005. Inhibitory effect of *Caesalpinia spinosa* leaflets crude extract on *Fusarium solani* and *Phoma tarda* (en línea). Acta Scientiarum Biological Sciences 27(2):185-188.
- FICKER, C.; SMITH, M.; AKPAGANA, K.; GBEASSOR, M.; ZHANG, J.; DURST, T.; ASSABGUI, R. 2003. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. Phytotherapy Research 17:897-902.
- GATTO M.A., IPPOLITO A., LINSALATA V., CASCARANO N.A., NIGRO F., VANADIA S., DI VENERE D. 2011. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology 61:72-82.
- GUIZZARDI M., CACCIONI D.R.L., PRATELLA G.C. 1995. Resistance monitoring of *Monilinia laxa* (Aderh. et Ruhl.) Honey to benzimidazoles and dicarboximides in postharvest stage. Journal of Plant Diseases and Protection 102 (1):86-90.

- HERNÁNDEZ LAUZARDO A.N., BAUTISTA S., VELÁSQUEZ DEL VALLE M.G. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30 (2):119-123.
- IDR Pronóstico de cosecha frutícola 2012/2013. <http://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2012/12/PRON%C3%93STICO-DE-COSECHA-FRUT%C3%8DCOLA-2012.pdf> [Consulta: 10 Setiembre 2013].
- KURIHARA, N.; MIYAMOTO, J.; PAULSON, G.D.; ZEEH, B.; SKIDMORE, M.W.; HOLLINGWORTH, R.M.; KUIPER, H.A. 1997. Chirality in synthetic agrochemicals: bioactivity and safety consideration (en línea). *Pure and Applied Chemistry* 69(6):1335-1348.
- MA Z., YOSHIMURA M.A., MICHAILIDES T.J. 2003. Identification and Characterization of Benzimidazole Resistance in *Monilinia fructicola* from Stone Fruit Orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology* 69:7145-7152.
- MICUCCI, P., ALONSO M. R., TURNER S., DAVICINO, R. y ANESINI, C. 2011. Antioxidant and antimicrobial activities of *Larrea divaricata* Cav. aqueous extract on vitamin C from natural orange juice. *Food and Nutrition Sciences* 2:35-46
- MINE SOYLU E., SOYLU S. Y KURT S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161:119-128
- MITIDIERI M., 2003. Enfermedades del duraznero. [en línea] http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/prv/mm_010.htm [Consulta: 12 Marzo 2012].
- OBERTI, R ; HAPON, M.V.; Pizzuolo, P.H.; HAPON, M.B.; GAMARRA LUQUES, C. 2012. Propiedades citotóxicas de *Prosopis strombulifera* sobre la línea celular HCT-116 de cáncer colonrectal humano. XII Jornadas de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 2003. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra, Suiza.
- PIZZUOLO P. 2001. Enzimi pectolitici prodotti da *Monilinia* spp.: importanza nella differenziazione delle specie e coinvolgimento nella patogenesi. Tesis Doctoral- Italia, 180 pag.
- PIZZUOLO P., LUCERO G., LUCERO H. y MARINI D. 2011. Capítulo 14. Principales enfermedades y su manejo. Producción de duraznos para industria. Ed Miguel Ojer-1ª ed- Mendoza: FCA-UNCuyo: Fe.pedi. 243 pag. ISBN 978-987-27642-0-3

- QUIROGA, E.N., SAMPIETRO, A.R. y VATTUONE, M.A. 2004. In Vitro fungitoxi activity of *Larrea divaricata* cav. Extracts. The society for applied microbiology. 39:7-12.
- QUIROGA, E.N.; SAMPIETRO, D.A.; SGARIGLIA, M. A.; SOBERÓN, J. R. y VATTUONE, M. A. 2009. "Antimycotic activity of 5'-prenylisoflavanones of the plant *Geoffroea decorticans*, against *Aspergillus* species". International Journal of Food Microbiology 132: 42-46.
- RANA B. K., SINGH U. P. y TANEJA V. 1997. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. Journal of Ethnopharmacology 57:29-34.
- REIGART, J. y ROBERTS, J. 1999. Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas. 5 ed. [en línea]. Washington, D.C. EPA, <http://www.epa.gov/oppfod01/safety/spanish/healthcare/handbook/contents.htm> [Consulta: 11 Marzo 2012].
- RIBEIRO, L.F. y BENDENDO, I.P. 1999. "Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da podridão de frutos demamoeiro". Scientia Agricola 56(4):1267-1271.
- ROIG, F. A. 2002. "Flora medicinal mendocina". Las plantas medicinales y aromáticas de la provincia de Mendoza (Argentina). Primera reimpresión. EDIUNC. Mendoza, Argentina. Páginas 11-12, 17, 125.
- ROSSINI M., GUIAYETTO A. y PAGELLA E. 2007. *Monilinia fructícola*: Un problema para la exportación de frutas de carozo argentinas. Fruticultura y diversificación 54: 21-25.
- RUIZ LEAL, A. 1972. "Contribuciones del Instituto de Investigaciones de zonas áridas". Deserta. pp. 101-102, 177.
- SALVAT; ANTONACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y. y GODOY, H. M. 2004. "Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina". Phytomedicine Vol 11, Issues 2-3, pp. 230-234.
- SILVA, R. A.; LÓPEZ de RUIZ, R. E. y RUIZ, S. O. 2004. "Estudio fitoquímico de flores de *Geoffroea decorticans* (Gill. Ex Hook. et Arm.) Burk, *Leguminosae* (*Fabaceae*)". Acta Farm. Bonaerense 23(4): 524-526.
- SOLIMAN K.M. y BADEAA R.I. 2002. "Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi". Food and Chemical Toxicology 40:1669-1675.
- TEQUIDA-MENESES M., CORTEZ-ROCHA M., ROSAS-BURGOS E. C., LÓPEZ-SANDOVAL S., CORRALES-MALDONADO C. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas

- silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Níger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. Revista Iboamericana de Micología 19:84-88.
- THEIS, N.; LERDAU, M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. International Journal of Plant Sciences 164(3):S93-S102.
- TRIPATHI P., DUBEY N.K., BANERJI R. y CHANSOURIA J.P.N., 2004. "Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of post-harvest rotting of citrus fruits". World Journal of Microbiology & Biotechnology 20: 317-321.
- STATPOINT TECHNOLOGIES INC. 2009. Statgraphics Centurion XVI version 16.0.07.
- ULIBARRI, E.; GÓMEZ SOSA E.; CIALDELLA A.; FORTUNATO R. y BAZZANO D. 2002. "Leguminosas nativas y exóticas". Biota Rioplatense VII. Editorial L.O.L.A. 320 pp.
- Universidad de Arizona. 1998. "Cultivos en zonas semiáridas: Chañar (*Geoffroea decorticans*). La revista del Riego Agromundial con guía de proveedores. N° 12, 41 pp.
- WIDMER T. L. y LAURENT N. 2006. "Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. pathogenic to *Theobroma cacao*". European Journal of Plant Pathology (115) 377-388.
- WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; EL GHAOUTH, A. y WISNIEWSKI, M. E. 1997. "Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*". Plant. Dis. 81: 204-210.
- WILSON, C. L.; EL GHAOUTH, A. y WISNIEWSKI M. E. 1999. "Prospecting in nature's store house for biopesticides. Rev. Mex. Fitopatol. 17: 49-53.