

Obtención y evaluación in vitro de la eficiencia de extractos con principios activos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), ajo (*Allium sativum*) y crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) como fungicidas naturales para el control de *Botrytis cinerea*, *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* presentes en el cultivo de rosas orgánicas.

Vladimir Aguirre¹, Vicente Delgado², María José Anrango³ & Nidia Díaz⁴.

¹Ph.D. profesor investigador, Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Investigaciones Científicas, Departamento de Ciencias Exactas, ESPE, PO Box: 171-5-231- B. Sangolquí – Ecuador. E-mail: vaaguirre@espe.edu.ec

²Dr. Profesor investigador, Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Investigaciones Científicas, Departamento de Ciencias de la Tierra y Construcción, ESPE, PO Box: 171-5-231- B. Sangolquí – Ecuador. E-mail: vadelgado@espe.edu.ec

³Ing. Asesora de investigación, Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Investigaciones Científicas, Departamento de Ciencias Exactas, ESPE, PO Box: 171-5-231- B. Sangolquí – Ecuador. E-mail: mjanrango@espe.edu.ec

⁴Tesista, Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Investigaciones Científicas, Departamento de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología, ESPE, PO Box: 171-5-231- B. Sangolquí – Ecuador. E-mail: nidiandrea@gmail.com

RESUMEN

Botrytis cinerea, *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* son hongos fitopatógenos presentes en el cultivo de rosas orgánicas. Para la contribución al control de estos hongos, se evaluó in vitro extractos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), ajo (*Allium sativum*) y crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Los extractos fueron obtenidos mediante hidrodestilación y maceración con solventes como alcohol 96% y agua. Se evaluaron concentraciones de 25, 50, 75 y 100% usando como diluyentes alcohol 96% y glicerina. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones en un diseño factorial completo 9x2x4x2. Las evaluaciones se hicieron a los 4 y 8 días para *Botrytis cinerea* y se registró el diámetro del halo de inhibición (mm) mientras que para *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* se hicieron evaluaciones a las 48 y 72 horas y se registró la proporción de conidios afectados con cambios morfológicos. Se realizó un

ANAVA y comparaciones mediante la prueba de Tukey al 0,05%. Los extractos que mostraron mejor eficiencia fungicida frente a *Botrytis cinerea* fueron el extracto alcohólico de eucalipto al 100%, el extracto alcohólico de ajo al 100% y 75% y el extracto alcohólico de crisantemo al 25% y 50%. Los extractos que mostraron mejor eficiencia fungicida frente a *Phragmidium mucronatum* fueron los extractos hidrodestilados de eucalipto al 25%, 50% y 75%; el extracto alcohólico de ajo al 50% y 100%, los extractos hidrodestilados de ajo al 25% , 50%, 75% y 100%, y el extracto alcohólico de crisantemo al 100% e hidrodestilado al 75%. Los extractos que mostraron mejor eficiencia fungicida frente a *Sphaerotheca pannosa* fueron los extractos hidrodestilado de eucalipto al 75%, alcohólico de eucalipto al 100%, hidrodestilado de eucalipto al 50%, el extracto alcohólico de ajo al 100% y el extracto alcohólico de crisantemo al 100%. Las mejor mezcla frente a *Botrytis cinerea* fue la mezcla B2, mientras que para el caso de *Phragmidium mucronatum* en todas las mezclas se observó pocas conidios afectados sin embargo la mezcla más eficiente es R9, y para *Sphaerotheca pannosa* todas las mezclas evaluadas presentaron excelentes resultados, resaltando entre estas la mezcla O9.

Palabras clave.- Hongos fitopatógenos, rosas orgánicas, eucalipto, ajo, crisantemo, halo de inhibición, proporción de conidios afectados.

ABSTRACT

Botrytis cinerea, *Phragmidium mucronatum* and *Sphaerotheca pannosa* are phytopathogenic fungi present during organic roses cultivation. In order to contribute to the control of these fungi, in vitro eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), garlic (*Allium sativum*) and chrysanthemum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) extracts were evaluated. The extracts were obtained through hydro distillation and maceration with solvents like alcohol 96% and water. Concentrations of 25, 50, 75 and 100% were evaluated using as diluents alcohol 96% and glycerin. Each treatment had five repetitions with a complete factorial design 9x2x4x2. The assessments were done at the days 4 and 8 for *Botrytis cinerea* registering the inhibition halo diameter (mm), while for *Phragmidium mucronatum* and *Sphaerotheca pannosa* the assessments were done at 48 and 72 hours registering the proportion of conidia affected by morphological changes. An ANAVA and comparisons using Tukey test at 0,05% were performed. The extracts that have shown better fungicide efficiency to *Botrytis cinerea* were the alcoholic extract of eucalyptus at 100%, the alcoholic extract of garlic at 100% and 75% and the alcoholic extract of chrysanthemum at 25% and 50%. The extracts that have shown better fungicide efficiency to *Phragmidium mucronatum* were the hydro distilled extract of eucalyptus at 25%, 50% and 75%, the alcoholic extract of garlic at 50% and 100%, and the hydro distilled extract of garlic at 25%, 50%, 75% and 100%, and the alcoholic and hydro distilled chrysanthemum extract at 100% and 75% respectively. The extracts that have shown better fungicide efficiency to *Sphaerotheca pannosa* were the hydro distilled and alcoholic extract of eucalyptus at 75% and 100%

respectively, hydro distilled extract of eucalyptus at 50%, the alcoholic extract of garlic at 100% and the alcoholic extract of chrysanthemum at 100%. The best mixture for *Botrytis cinerea* was the B2, while in the case of *Phragmidium mucronatum* every mixture showed only a few conidia affected however the most efficient mixture is R9, finally for *Sphaerotheca pannosa* every evaluated mixture showed excellent results, being the most highlighted the mixture O9.

Key words.- *Botrytis cinerea*, *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa*, organic roses, eucalyptus, garlic, chrysanthemum, inhibition, proportion of conidia affected.

INTRODUCCIÓN

El moho gris, roya del rosal y mildiu polvo en el cultivo de rosas son enfermedades causadas por *Botrytis cinerea*, *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* respectivamente, estos hongos fitopatógenos crecen y se desarrollan a temperaturas superiores a los 20°C en condiciones de alta humedad (Álvarez, 2005 & Bello, 2011).

Botrytis cinerea penetra en el rosal mediante heridas, presenta un crecimiento de color gris o blanco pudiendo ser de forma micelial, esclerocial o esporulante, infecta con frecuencia a las inflorescencias causando detención en su desarrollo y posterior pudrición (Arias & Jerez, 2008). *Phragmidium mucronatum* posee uredosporas individuales generalmente equinuladas además de teliosporas robustas, penetra en la planta y se extiende hacia afuera superficialmente presentando un crecimiento en forma de pústulas anaranjadas o amarillentas en el envés de las hojas, estructuras que al romperse liberan gran cantidad de esporas, las cuales se dispersan con facilidad con el viento (Álvarez, 2005; Bello, 2001; Botanical, 2011). *Sphaerotheca pannosa* tiene como cuerpo fructífero un ascocarpo y sus conidios se encuentran dispuestos en cadenas, exhibe diversos ciclos de vida en su infección, su crecimiento se manifiesta formando un tapiz blanco polvoriento en forma de manchas en las superficies de partes tiernas del rosal (Buczacki, 1999; Cabrera, *et al.*, 2006).

El manejo de cultivos basado en el uso de productos químicos ha aumentado en los fitopatógenos la presión de selección creando poblaciones resistentes, además del impacto sobre los seres humanos y el medio ambiente. Esto conlleva a la búsqueda de nuevas alternativas de manejo de enfermedades como la utilización de extractos vegetales, que es una opción que permite una producción agrícola sostenible y menos contaminante (Viveros & Castaño, 2006).

Los extractos de plantas constan de mezclas de compuestos activos producto del metabolismo secundario vegetal. La actividad biológica de estas sustancias se debe al sinergismo entre ellos, ya que por separado poseen mucha menor actividad que cuando se encuentran juntos. Los coadyuvantes contenidos en menor proporción hacen posible

el desarrollo óptimo de los principios activos, contribuyendo de esta manera en la absorción y reforzamiento del efecto antimicótico (Viveros & Castaño, 2006).

En este artículo se presenta la evaluación de la eficiencia de los extractos de eucalipto, ajo y crisantemo como fungicidas naturales para el control *Botrytis cinerea*, *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* presentes en el cultivo de rosas orgánicas, con el fin de aportar con una alternativa viable para incentivar el desarrollo de la agricultura orgánica.

METODOLOGÍA

Colección de muestras vegetales para obtención de extractos.- Se recolectó hojas jóvenes de eucalipto, bulbos de ajo y flores de crisantemo. Las muestras vegetales de eucalipto fueron colectadas en el campus de la Escuela Politécnica del Ejército, de ajo en el mercado de Sangolquí y de crisantemo en la localidad de Cochasquí.

Colección de muestras vegetales infectadas por hongos fitopatógenos.- Las muestras vegetales de rosas orgánicas infectadas fueron colectadas en la hacienda Monterrey de la florícola Nevado Roses Ecuador S.A. en el mes de septiembre del 2011 y en el mes de junio del 2012.

Se recolectó flores de rosas de la variedad Vitality las cuales presentaban en sus pétalos manchas no uniformes de color rojo purpuras, características que hacen evidente la infección por *Botrytis cinerea*. Para el caso del hongo *Phragmidium mucronatum* se recolectó hojas de rosas de la variedad Heart, las cuales en su envés presentaban pústulas redondas definidas de color amarillo anaranjadas; características que denotan la infección por parte de este hongo. Se recolectó hojas tiernas y pedúnculos florales de rosas de la variedad Vitality, las hojas presentaban un polvo fino de color blanco en el haz y en el envés manchas de color rojo purpura, mientras que en los pedúnculos florales se visualizó el polvo fino de color blanco alrededor.

Adicionalmente se colectó hojas no infectadas de las variedades mencionadas con el propósito de usarlas en la reproducción de *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* en el laboratorio.

Aislamiento de hongos fitopatógenos.- Se realizó cámaras húmedas con las flores infectadas por los tres hongos, se incubó las cámaras colgadas durante 10 días a temperatura ambiente 20 ± 3 °C.

Para el aislamiento de *Botrytis cinerea* se escogió las cámaras con más crecimiento fúngico, en la cámara de flujo laminar se cortó cinco pedazos de 15 mm^2 de la parte afectada de cada flor, se desinfectaron en hipoclorito de sodio 2,5% por 10 segundos, se lavó en agua destilada estéril por 15 segundos y se dejó secar sobre una toalla de papel cerca del mechero durante 5 minutos. Una vez secas en condiciones estériles los trozos de flor infectados fueron colocados en el centro sobre el medio de cultivo PDA. Se dejó

incubar por 8 días a temperatura ambiente 20 ± 3 °C. Para obtener cultivos axénicos se realizó resiembras, para lo cual se corto cuadrados de 10 mm^2 de medio PDA con crecimiento activo del hongo y se transfirió a medio PDA fresco.

De las cámaras se escogió las hojas que presentaban crecimiento activo de *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* y se realizó nuevamente cámaras húmedas junto con hojas no infectadas de rosas de variedad Vitality y Heart respectivamente, se incubó a temperatura ambiente 20 ± 3 °C para estimular el crecimiento masivo de los hongos.

Obtención de extractos.- Se obtuvo los extractos mediante hidrodestilación y maceración con solventes.

Los extractos hidrodestilados fueron obtenidos mediante el equipo de hidrodestilación, el cual constó de un balón de 1L conectado a un refrigerante de serpentín con sus respectivas mangueras, una de entrada de agua y la otra de salida, en su parte inferior se acopló una trampa Dean Stark la cual a su vez en la parte inferior derecha se encajó el balón de destilación el mismo que se encontraba a un centímetro de la plancha de calentamiento.

Los extractos alcohólicos se obtuvieron macerando las muestras vegetales picadas por 8 días en alcohol 96%, en frascos ámbar a temperatura ambiente 20 ± 3 °C. Se filtraron al vacío con papel Whatman No. 4, se evaporaron a presión reducida en rotavapor a $35\text{--}37$ °C durante 2 horas, se pesaron, se filtraron en filtro de jeringa micropore 0.45μ y se conservaron en frascos ámbar en refrigeración a 4°C.

El extracto acuoso de eucalipto se obtuvo macerando las muestras vegetales picadas en agua destilada caliente por 24 horas, mientras que los extractos de ajo y crisantemo se obtuvieron macerando las muestras vegetales picadas en agua destilada por 72 horas. Se filtro al vacío y se evaporaron a presión reducida en rotavapor a 40°C durante 2 horas, se pesaron, se filtraron en filtro de jeringa micropore 0.45μ y se conservaron en frascos ámbar en refrigeración a 4°C.

Análisis de extractos obtenidos.- Se evaluaron características físicas como el color, olor, apariencia y densidad, y químicas como el pH y el índice de refracción. Se analizó los principios activos presentes en cada extracto mediante cromatografía en capa fina.

Se utilizó como fase estacionaria placas de silicagel 60 F₂₅₄ de 20 x 20 cm con soporte de vidrio, y como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo (9:1) para los extractos de eucalipto y crisantemo, y una mezcla de butanol: alcohol isopropílico: ácido acético glacial: agua (30:10:10:10) para los extractos de ajo.

Las placas fueron activadas en estufa a 100°C durante 30 minutos. Se dejó eluir en oscuridad por 1h30min los extractos de eucalipto y crisantemo y por 45 minutos los extractos de ajo. Se observó las cromatoplas en luz UV, se revelaron aplicando vainillina sulfúrica a las placas con extractos de eucalipto y crisantemo, y ninhidrina 1% a las placas con extractos de ajo, se secaron en estufa a 100°C durante 10 minutos. Se

identificó los principios activos por el color característico que presentaban los componentes y por su valor de Factor de Retención (Rf).

Evaluación de la eficiencia fungicida de los extractos.- Se evaluaron los extractos vegetales al 25, 50, 75 y 100% de extracto, diluidos en glicerina y alcohol 96%.

Para la evaluación frente a *Botrytis cinerea* se realizaron mediciones en milímetros (mm) del halo de inhibición formado en medio PDA al cuarto y octavo día de incubación a 20 ± 3 °C, mientras que para la evaluación frente a *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* se consideró la proporción de conidios afectados con cambios morfológicos a las 48 y 72 horas de incubación a 20 ± 3 °C usando la técnica de preparación húmeda. Las mediciones de halos de inhibición se llevó a cabo con un calibrador y la identificación de cambios morfológicos en microscopio óptico de campo claro en 10x, 40x y 100x.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento de extracción de los extractos vegetales va decreciendo de acuerdo al método utilizado, de forma que la mayor eficiencia es para la extracción acuosa, seguida por la extracción alcohólica y finalmente la extracción hidrodestilada. Cuando se pone en contacto la muestra vegetal con el solvente, las células vegetales tienden a aumentar la permeabilidad de la pared celular lo cual permite la difusión del solvente hasta llegar a un estado de turgencia; el grado de hinchamiento al que llegan las células vegetales para liberar los principios activos depende de las propiedades del solvente. El agua es solvente adecuado para ingresar a las células debido a que es un constituyente principal, explicando de este modo el volumen de extracto acuoso que se obtiene en el filtrado y concentrado (Sharapin, 2000, Villacís, 2009).

Adicionalmente a esto, los altos rendimientos obtenidos en las extracciones acuosas y alcohólicas, pueden deberse a dos factores, el tratamiento de muestras vegetales y la no disposición de los equipos necesarios para montar un sistema óptimo de concentración en rotavapor; en cuanto al tratamiento de muestras vegetales en el presente estudio no fueron secadas debido a que no se disponía de una cámara con aire caliente circundante adecuado para secar las muestras; y lo que se refiere al sistema de concentración en rotavapor no se contó con una bomba de vacío regulable la presión, lo que dificultó evaporar un poco más de agua de los extractos concentrados al disminuir la presión, no obstante para compensar esta dificultad una opción era subir la temperatura de evaporación, sin embargo no se realizó ya que al momento de subir la temperatura se corre el riesgo de perder principios activos en los extractos, por su naturaleza volátil a determinadas temperaturas, lo cual no era conveniente.

Los valores de pH, densidad e índice de refracción de los extractos se encontraron dentro de lo establecido en la Farmacopea Nacional Argentina. El pH es un factor importante que debe presentar el extracto vegetal ya que si es el óptimo favorece la

estabilidad de algunos principios activos (Aragdvay, 2009). Los valores de pH límites de extractos vegetales a ser aplicados en producción vegetal deben encontrarse entre 4 y 9, debido a que soluciones muy ácidas o muy alcalinas hechan a perder los cultivos (Barbado, 2005). Con el índice de refracción se determina la pureza de los extractos o esencias (Soto, 2011) y con la densidad se comprueba la calidad de los extractos vegetales (Milanés *et al*, 1999).

La cromatografía en capa fina realizada para los extractos de eucalipto revela la presencia de eucaliptol en los extractos alcohólico e hidrodestilado, presentando un Rf de 0.425 (Figura 1).

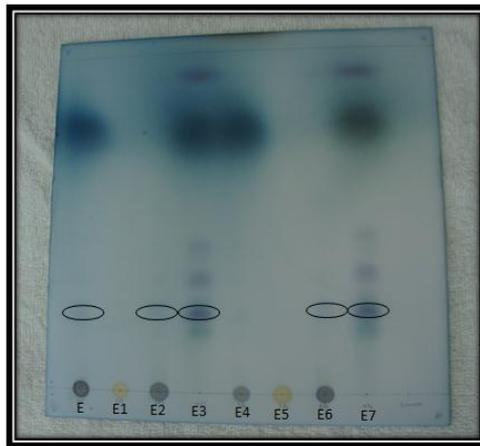


Figura 1. Cromatografía en capa fina de los extractos de eucalipto *Eucalyptus globulus*. E: Estándar de eucaliptol, E1: Extracto acuoso diluido con alcohol 96%, E2: Extracto alcohólico diluido con alcohol 96%, E3: Extracto hidrodestilado diluido con alcohol 96%, E4: Estándar diluido con acetona, E5: Extracto acuoso diluido con acetona, E6: Extracto alcohólico diluido con acetona, E7: Extracto hidrodestilado diluido con acetona.

Los resultados de la cromatografía de los extractos de ajo confirman la presencia de compuestos azufrados en los extractos acuoso y alcohólico, con un Rf de 0.5 (Figura 2).

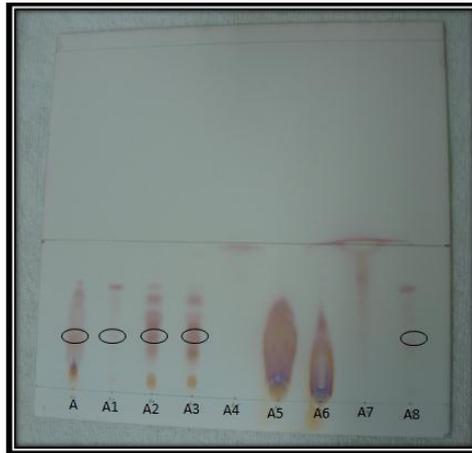


Figura 2. Cromatografía en capa fina de los extractos de ajo *Allium sativum*. A: Extracto acuoso de cápsulas de ajo, A1: Extracto alcohólico de cápsulas de ajo, A2: Extracto acuoso diluido en alcohol 96%, A3: Extracto alcohólico diluido en alcohol 96%, A4: Extracto hidrodestilado diluido en alcohol 96%, A5: Extracto acuoso no diluido, A6: Extracto alcohólico no diluido, A7: Extracto hidrodestilado no diluido, A8: Extracto alcohólico de cápsulas de ajo no diluido.

Mientras que la cromatografía de los extractos de crisantemo señala la presencia de piretrinas en el extracto alcohólico y el extracto acuoso, presentando una mancha con Rf de 0.05 para el acuoso y para los alcohólicos dos manchas con Rf de 0.05 y 0.15 (Figura 3).



Figura 3. Cromatografía en capa fina de los extractos de crisantemo *Chrysanthemum cinerariaefolium*. C: Estándar secundario Pyretrum extract diluido en alcohol 96%, C1: Estándar primario Piretrinas y Piretroides diluido en alcohol 96%, C2: Extracto acuoso diluido en alcohol 96%, C3: Extracto alcohólico diluido en alcohol 96%, C4: Agua de hidrodestilación diluido en alcohol, C5: Extracto acuoso no diluido, C6: Extracto alcohólico no diluido, C7: Agua de hidrodestilación no diluida, C8: Extracto etéreo diluido en alcohol 96%.

El eucaliptol debido a su volatilidad y bajo peso molecular puede atravesar estructuras de especies fúngica fácilmente. El daño a la membrana citoplasmática se enfoca principalmente al oxígeno presente en su estructura química, ya que a raíz de del oxígeno se originan diversas especies reactivas del oxígeno “ROS” (iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos), estos ROS desestabilizan la bicapa lipídica mediante peroxidación, promoviendo la formación de poros por los cuales que difunden moléculas e iones (K^+ y H^+), lo que finalmente compromete la viabilidad de la membrana, además producen daños a proteínas, péptidos, ADN mitocondrial y celular. (Creces 1983, Avello et al, 2012, Rincón et al, 2012).

Los compuestos azufrados por su parte inhiben actividad enzimática de diversas enzimas celulares (fosfatasa alcalina, invertasa, ureasa) , se ligan a los grupos tiol de las proteínas y polipéptidos causando degradación de polímeros de la pared celular de muchos hongos, desestabilizando canales de membrana, además de disgregar los ribosomas e intervenir en la síntesis de ADN tanto mitocondrial como celular (Domingo & López, 2008; Ferrada &Farias, 2005; Hernández, 2003; Isman, 2000; Selitrennikoff, 2001; Slusarenko, et al., 2008).

Las piretrinas en cambio interfieren en la bomba sodio – potasio, postergan el cierre del canal de sodio de la membrana celular (células animales), que es lo que permite que los nutrientes ingresen (Na^+) y salgan (K^+) de las células; al no cerrarse ese canal se produce un impulso nervioso permanente que termina liquidando al insecto (León, 2000). Las células vegetales, hongos y bacterias no tienen la bomba sodio – potasio sino la bomba de electrógena, es una bomba de protones que transporta activamente H^+ hacia afuera de la célula (Campbell & Reece, 2007). En este trabajo los extractos de crisantemo eficientes se podría decir que interfirieron básicamente en la bomba electrógena de los hongos evaluados, del mismo modo que en la bomba de sodio - potasio.

La alicina no se pierde sino que transforma según las condiciones en otros compuestos azufrados tales como el dialil disulfuro, dialil sulfuro, etc (Gómez Gómez, 2008); entonces en este contexto los resultados obtenidos en el presente trabajo tanto en la cromatografía en fina y en la eficiencia fungicida podrían deberse a la acción de compuestos producto de la transformación de alicina o quizá a compuestos no azufrados del ajo como lo son las saponinas, también presentes en el ajo.

El dialil sulfuro y dialil disulfuro según estudios realizados en la Universidad de Washigton tienen capacidad para eliminar microorganismos en cien veces más efectividad que los antibióticos (Alkemi, 2012), capacidad antitumoral y anticancerígena (Padilla & Zaitseva, 2010, Palencia, 2010). Por otro lado las saponinas son glucósidos solubles en agua y etanol, su contenido en el ajo varía entre 0.1 al 5%, se encuentran en las partes externas del ajo, y constituyen parte importante en la defensa contra patógenos, especialmente hongos, manifiestan Valle, 2000 en su estudio acerca de la toxicología de alimentos y Hall et al, 2002 en su reporte de plantas medicinales.

Las piretrinas por su parte son inestables en condiciones ambientales en el campo debido a que en su estructura poseen un grupo éster, sin embargo son estables cuando las condiciones ambientales son normales controladas, ya que en estas condiciones estas tienen una acción excelente y rápida reportan Montalvo et al, 1996.

Los hongos fitopatógenos aislados del cultivo de rosas orgánicas fueron *Botrytis cinerea*, *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa*. *Botrytis cinerea* se estableció en medio Potato Dextrosa Agar PDA (Figura 4) por ser un hongo que no requiere condiciones exigentes para crecer y desarrollarse (Arias & Jerez, 2008); *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* se implantaron en cámara húmeda (Figura 5 y 6) ya que son patógenos obligados porque dependen de su hospedero para mantenerse (Mansilla & Pintos, 2000).

En la identificación macro/microscópica de *Botrytis cinerea* (Figura 4), *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* (Figura 5 y 6) se observaron todas las estructuras fúngicas características de estos hongos de acuerdo con Arias y Jerez, 2008 y Barnett & Hunter, 2000.

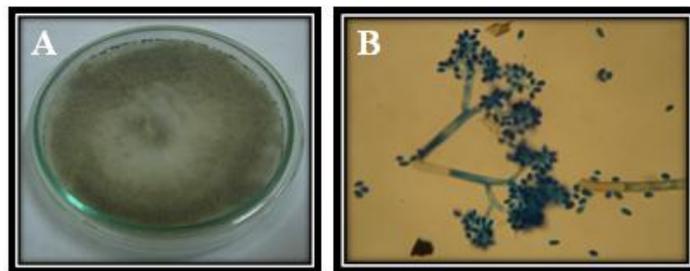


Figura 4. A) *Botrytis cinerea* en medio PDA al octavo día de incubación. B) Estructuras fúngicas de *Botrytis cinerea*, campo claro objetivo 100x.

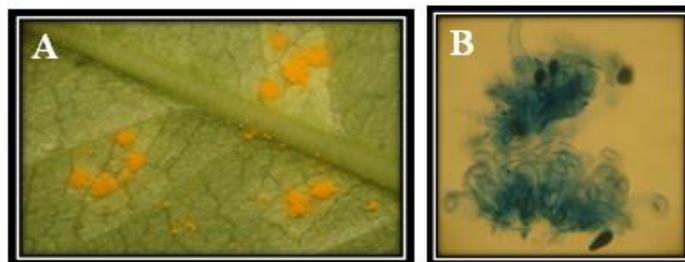


Figura 5. A) *Phragmidium mucronatum* en el envés de la hoja, estereomicroscopio Leica S4E. B) Estructuras fúngicas de *Phragmidium mucronatum*, campo claro objetivo 100x.

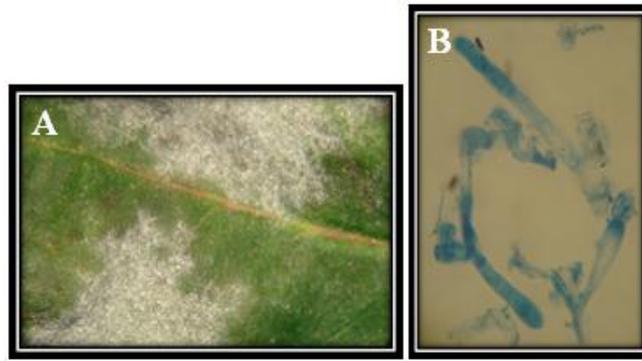


Figura 6. A) *Sphaerotheca pannosa* en el haz de la hoja, estereomicroscopio Leica S4E. B) Estructuras fúngicas de *Sphaerotheca pannosa*, campo claro objetivo 100x.

El efecto fungicida de los extractos vegetales sobre *Botrytis cinerea*, *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* fue variable, y se observaron diferencias estadísticas significativas entre los distintos extractos de cada una de las tres especies vegetales.

El análisis de varianza del diámetro de halo de inhibición de *Botrytis cinerea* y de la proporción de conidios afectados de *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* al cuarto y octavo día de incubación presentó diferencias altamente significativas entre los tratamientos. De los extractos vegetales evaluados sobre *Botrytis cinerea* mostraron un efecto fungicida el extracto alcohólico de eucalipto al 100% (Figura 7B), el extracto alcohólico de ajo al 100% (Figuras 7A) y el extracto alcohólico de crisantemo al 25% diluido en glicerina (Figura 7C) al cuarto día de incubación presentando un halo de inhibición media de 7.94, 10.40 y 6.94 mm respectivamente.

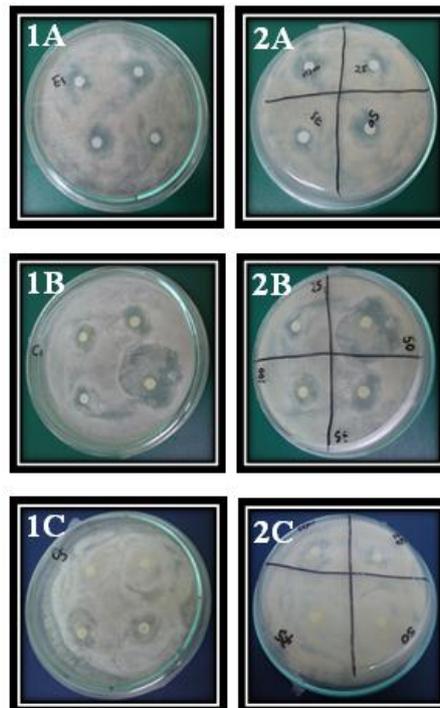


Figura 7. Halos de inhibición formados por acción de extractos vegetales sobre *Botrytis cinerea*. A) Extractos de eucalipto. B) Extractos de ajo. C) Extractos de crisantemo.

Al evaluar la eficiencia fungicida frente a *Phragmidium mucronatum* los extractos de eucalipto que presentan mayor eficiencia son los extractos hidrodestilados al 50 y 75% diluidos en alcohol 96% a las 48 horas de incubación y los hidrodestilados al 25 y 75% diluidos en alcohol 96% a las 72 horas de incubación con proporción de conidios afectados de 0.93 para los primeros y 0.88 para los segundos; los mejores extractos de ajo con proporción de conidios afectados media de 0.99, 0.98 y 0.97 son los hidrodestilados al 25,50, 75 y 100% y los alcohólicos al 50, 75 y 100% tanto los diluidos en alcohol 96% como glicerina a las 72 horas de incubación y los extractos de crisantemo más eficientes son el extracto alcohólico al 100% y el extracto hidrodestilado al 75% diluido en glicerina a las 48 horas de incubación con una proporción media de conidios afectados de 0.27.

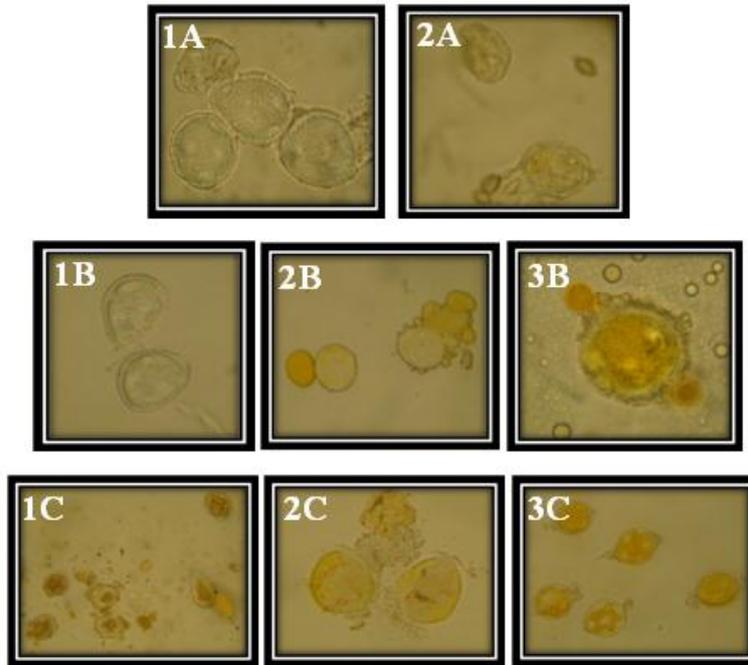


Figura 8. Cambios morfológicos en conidios de *Phragmidium mucronatum* causados por extractos vegetales. A) Extractos de eucalipto. B) Extractos de ajo. C) Extractos de crisantemo.

En la evaluación de los extractos contra *Sphaerotheca pannosa* los extractos de eucalipto hidrodestilados al 50 y 75% diluidos en alcohol 96%, alcohólico al 100% a las 72 horas de incubación con 0.96, 0.99 y 0.96 proporción media de conidios afectados; el extracto alcohólico de ajo al 100% a las 48 horas de incubación con proporción de conidios afectados media de 0.71 y los extractos alcohólicos de crisantemo al 100% a las 72 horas de incubación presentando una proporción media de conidios afectados de 1.00.

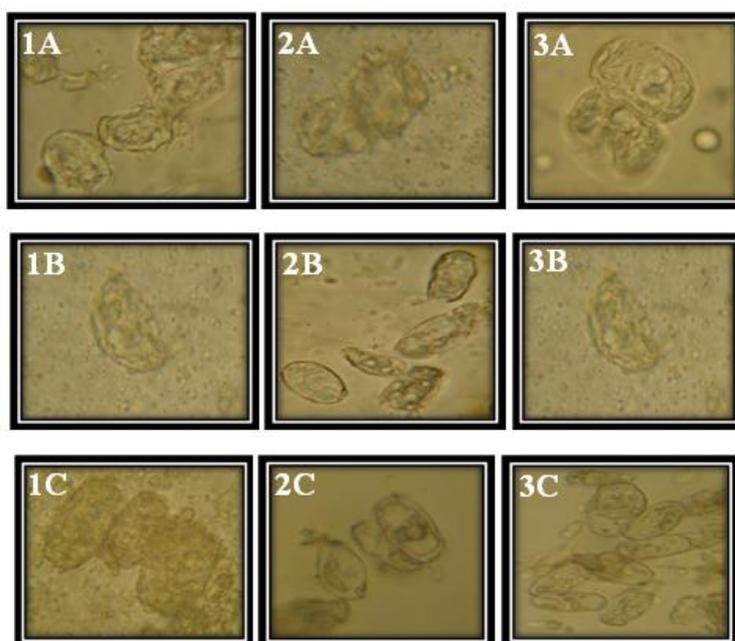


Figura 9. Cambios morfológicos en conidios de *Sphaerotheca pannosa* causados por extractos vegetales. A) Extractos de eucalipto. B) Extractos de ajo. C) Extractos de crisantemo.

Al evaluar las mezclas de los extractos de eucalipto, ajo y crisantemo frente a *Botrytis cinerea* se obtuvieron buenos resultados con la mezcla B1 (extracto alcohólico de eucalipto y extracto acuoso al 100%), B2 (extracto alcohólico de eucalipto al 100% y crisantemo alcohólico al 25% diluido en glicerina) y B4 (extracto alcohólico de eucalipto, extracto acuoso al 100% y crisantemo alcohólico al 25% diluido en glicerina) al cuarto día de incubación, presentando medias del diámetro del halo de inhibición de 11,67 mm, 14,74 mm y 10,18 mm respectivamente.

Por otra parte al aplicar las mezclas de extractos vegetales sobre *Phragmidium mucronatum* se obtuvo baja proporción de conidios afectados en comparación a la evaluación individual de los extractos, verificando este comportamiento tanto a las 48 horas de como a las 72 horas de incubación llegando a una proporción de conidios afectados media de 0.22 para las siete mezclas evaluadas.

En cambio al exponer los conidios de *Sphaerotheca pannosa* a las mezclas de extractos vegetales se identificaron cambios morfológicos en gran parte de ellos para las diez mezclas evaluadas a las 48 y 72 horas de incubación, presentado una proporción de conidios afectados media de 0.95.

CONCLUSIONES

El rendimiento de obtención de los extractos de *Eucalyptus globulus*, *Allium sativum* y *Chrysanthemum cinerariaefolium* por maceración con agua y alcohol 96% fue alto, esto debido a factores tanto de tratamiento muestras vegetales como del proceso de concentración de extractos en rotavapor.

Los resultados en la determinación de los parámetros físico – químicos de cada uno de los extractos vegetales estuvieron acorde con lo establecido en la Farmacopea Nacional Argentina, asegurando de esta manera la calidad de los extractos y por ende la conservación de las propiedades antimicrobianas.

Realizado el ensayo de diluyentes se concluyó que la glicerina y alcohol 96% son inocuos para los hongos fitopatógenos investigados en este estudio, por lo que se eligió trabajar con estos, descartando totalmente al texapon debido a su alto poder fungicida.

Mediante la técnica de cromatografía en capa fina se determinó la presencia de componentes mayoritarios en cada extracto, en el eucalipto de eucaliptol, en el ajo una variedad de compuestos azufrados y en el crisantemo las piretrinas.

Las tres especies vegetales eucalipto, ajo y crisantemo evaluadas *in vitro* tanto individualmente como en mezclas tienen alto potencial fungicida y por ende son aptas para ser utilizadas para mantener los cultivos orgánicos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la florícola Nevado Roses Ecuador S.A., por facilitar información acerca de su cultivo y por proporcionar muestras de rosas orgánicas infectadas por hongos fitopatógenos. Al Ing. Luis Cumbal PhD., Director del Centro de Investigaciones Científicas, por permitir que se desarrolle este proyecto en los laboratorios de Biotecnología Ambiental. Al Ing. Vladimir Aguirre PhD., Dr. Vicente Delgado e Ing. María José Anrango, por su constante colaboración y aporte valioso en conocimientos.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, M. (2005). Rosas. Jardinería práctica: Enfermedades de los rosales. Editorial Albatros. p.:22-24.
- Aragadvay, S. (2009). Elaboración y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de chilca (*Baccharis latifolia*) y hierbamora (*Solanum nigrum*). Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Ecuador: Escuela Superior <politécnica de Chimborazo.
- Arias, J. & Jerez, A. (2008). Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de

corte cultivadas en la sabana de Bogotá. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.

- Avello, M., López, C., Gatica, C., Bustos, E., Brieva, A., Pastene, E. & Bittner, M.** (2012). Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae Revista Cubana de Plantas Medicinales: 17,1. Habana – Cuba.
- Rincón, A., Castaño, J., & Ríos, E.** (2012). Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. Revista Cubana de Plantas Medicinales: 17, 2. Habana – Cuba.
- Barbado, J.** (2005). Hidroponía. Primera Edición. Buenos Aires-Argentina: Editorial Albatros. Pp.: 47-48.
- Bello, A.** (2001). Jardinería básica N° 1. Enfermedades en ramas, hojas y frutos. El Oídio.
- Botanical** (2011). El mundo de las plantas: Enfermedades fúngicas de las plantas. Extraído el 02 de mayo, 2011 de: <http://www.botanical-online.com/enfermedadesdelasplantas.htm>.
- Buczacki, S.** (1999). Rosales: Plagas y enfermedades. Ediciones AKAL. pp.:26-31.
- Cabrera, M., Álvarez, R. & Sosa de Castro, N. (2006). Patologías que afectan a *Rosa* sp. en Corrientes, Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Extraído el 02 de mayo, 2011 de: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/05-Agrarias/2006-A-023.pdf>.
- Calderón, E., Nigrinis, S. & Calle, J.** (2000). Estudio de Aceite esencial colombianos III aceites esenciales de *Eucalyptus* I. Revista Colombiana de Ciencias Químico – Farmaceuticas.
- Campbell, N. & Reece, J.** (2007). Biología. Bomba electrogénica. Editor Ed. Médica Panamericana.
- Guevara, M., López, G., Ortega, R., Castellanos, K., Pastelín, M., & Catañeda, O.** (2010). Aplicación de extracto de *Chrysanthemum morifolium* al cultivo in vitro de *Anthurium andreanum* L. variedad *Anthapck*. Laboratorio de Biotecnología y Criobiología vegetal. Facultad de Ciencias Químicas. México: Universidad Veracruzana. Congreso Internacional de QFB 2010.
- Mansilla, J. & Pintos, C.** (2000). Principales enfermedades de los frutales de hueso: tratamientos. Los principales daños a estos cultivos son ocasionados por distintas especies de hongos. Estación Fitopatológica “Do Areeiro” Pontevedra.
- Martínez, A.** (2009). Aceites esenciales. Facultad de Química y Farmacéutica. Colombia: Universidad de Antioquia.
- Montalvo, E., Hernández, M., Solís, J. & Durán, M.** (1996). Determinación de rendimientos de extracción de piretrinas en residuos del cultivo de

crisantemo. Instituto de Ciencias Básicas. Universidad Veracruzana. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)*, 11(1-2), 42-53.

- Murillo, E., Lombo, O., Tique, M. & Méndez, J.** (2007). Potencial antioxidante de *Bauhinia Kalbreyeri Harms* (Fabaceae). *Información Tecnológica .La Serena*2007, 18(6), 65-74.
- Quinche, G.** (2009). Control de Botrytis (*Botrytis cinera*) y Mildiu veloso (*Peronospora sparsa*) en el cultivo de rosa (*rosa sp*, Variedad Forever Young) mediante el uso de *Trichoderma harzianum Rifai*. Facultad de Recursos Naturales. Escuela De Ingeniería Agronómica. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Sharapín, N.** (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Volumen 78 de Ciencia y Tecnología. Convenio Andrés Bello.
- Valencia, G. & Martínez, A.** (2001). Guía para el reconocimiento de drogas vegetales por cromatografía en capa fina. Facultad de Química y Farmacia. Departamento de Farmacia. Colombia: Universidad de Antioquia.
- Villacís, J.** (2009). Temas de Medicina Natural. Pp.:18, 35, 38, 39, 49,53. Fitomedicina Quito.
- Viveros, J. & Castaño, J.** (2006). Evaluación *in vitro* de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis*. Morelet. Revista Agronomía, 14 (1), 37-50.