



Universidad Nacional de Rosario  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Licenciatura en Recursos Naturales

*“Estudio de Compuestos Vegetales con potencial acción fungicida sobre patógenos de plantas de interés regional”*

Alumno: Badaracco Paula

Director: Dra. Ing. Agr. Rosanna N. Pioli  
Profesor Asociado (AC) B. Criptogámica FCA.UNR

Co-Director: Dr. Maximiliano Sortino  
Profesor Farmacognosia FCBF.UNR

Lugar de Trabajo: Botánica Criptogámica, Lab. Biodiversidad Vegetal y Microbiana. Fac. Ciencias Agrarias, UNR.

Año: 2018

## ÍNDICE

Agradecimientos.....	3
Resumen en Español.....	4
Resumen en Ingles.....	5
Introducción.....	6
Materiales y Métodos.....	10
Resultados.....	16
Discusión.....	32
Conclusión.....	37
Bibliografía.....	39

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi Directora de Tesina, la **Dra. Rosanna N. Pioli**, por el tiempo y compromiso en mi formación profesional en el marco de un Proyecto formal basado en el conocimiento integrado de diversas interacciones biológicas (PID.UNR 287) y los recursos asignados en el contexto del Proyecto Institucional del IICAR (CONICET-UNR).

Mi gratitud por su disposición y profesionalidad a mi co-Director, el **Dr. Maximiliano Sortino**, quien me ha brindado su tiempo y me ha aconsejado de manera de sortear los obstáculos que surgieron durante el desarrollo de esta tesina.

Muchas gracias por todo a la asignatura **Botánica Criptogámica** por el espacio, recursos y metodología para aislar e identificar comunidades fúngicas a partir de sus interacciones biológicas y los docentes de la cátedra de **Fitopatología** que actualmente comparten el ámbito de trabajo como a aquellos que ya no están. Sin el acompañamiento y la paciencia de ustedes, hoy no estaría acá.

También agradezco a los integrantes de la cátedra de **Farmacognosia** (Facultad de Bioquímica) por brindarme su espacio y paciencia en el desarrollo de la metodología de evaluación de efecto antifúngico de compuestos vegetales de mi Tesina.

Gracias a mis **Amigos y Compañeros** por la comprensión y acompañamiento durante este momento y toda mi vida universitaria. Mediante mate, asado u otras comidas me aguantaron por varios años.

Y sobre todo mi gratitud a mi **Familia**, quienes me acompañaron y apoyaron constantemente a lo largo de mi carrera universitaria más allá de los kilómetros que nos separaban.

## RESUMEN

Evolutivamente las plantas han debido adaptarse al ambiente donde se desarrollaron. Dentro de los factores que pueden condicionar su crecimiento y desarrollo se encuentran las poblaciones fúngicas, algunas de las cuales pueden generar enfermedades, que desde el punto de vista productivo afectan el rendimiento y posibilidad de generar alimentos primarios y derivados. Actualmente se utilizan productos fitosanitarios, los cuales controlan las enfermedades pero el uso inapropiado supone un riesgo para la salud humana y el ambiente. Frente a esta realidad surge, como una opción sustentable, la utilización de los compuestos vegetales como potenciales productos antifúngicos o bio-fungicidas. La actividad antimicrobiana puede estar desempeñada por metabolitos secundarios vegetales. En este estudio se evaluaron seis compuestos naturales de origen vegetal: daidzeína, genisteína, dos chalconas (CH1 y CH2), vainillina (3 hidroxí- 4 metoxi-benzaldehído), iso-vainillina (4 metoxi-3 hidroxí-benzaldehído) y dos productos fungicidas comerciales cuyos principios activos son azoxistrobina y carbendazim. Se evaluó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de cada compuesto químico mediante el método de microdilución frente a cinco géneros fúngicos: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Phomopsis* y *Rhizopus* por ser agentes causales de patologías vegetales. Los resultados demostraron que daidzeína, genisteína y la chalcona CH1 no presentaron acción inhibitoria en concentraciones menores a 250 µg/ml mientras que la chalcona CH2 presentó actividad frente varios géneros fúngicos. Por su parte la vainillina ha demostrado ser efectivo para inhibir todos los patógenos evaluados con concentraciones menores a 250 µg/ml pero no así la iso-vainillina. En relación a los productos comerciales, ambos han demostrado acción inhibitoria frente a la mayoría de los patógenos evaluados aunque existieron excepciones. Se concluye que los metabolitos vegetales como la chalcona CH2 y vainillina pueden inhibir el crecimiento de los hongos patógenos evaluados, constituyéndose como potenciales bio-fungicidas.

## SUMMARY

Evolutively plants have adapted to the environment where they developed. Among the factors that can condition its growth and development are the fungal populations. Some fungal organisms can generate diseases, which from the productive point of view affect the yield and possibility of generating primary foods and derivatives. Phytosanitary products are currently used for controlling diseases but an inappropriate use can be a risk to human health and the environment. According to this reality, the use of plant compounds as potential antifungal or bio-fungicidal products arises as a sustainable option. The antimicrobial activity may be exerted by secondary plant metabolites. This study analyzed and evaluated six natural compounds of plant origin: daidzein, genistein, two chalcones (CH1 and CH2), vanillin (3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde), iso-vanillin (4-methoxy-3-hydroxy-benzaldehyde) and two commercial fungicidal products whose active principles are azoxystrobin and carbendazim. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of each chemical compound was evaluated by means of the microdilution method against five fungal genera: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Phomopsis* and *Rhizopus* because they are causal agents of plant pathologies. The results showed that daidzein, genistein and chalcone CH1 showed no inhibitory action at concentrations lower than 250 µg/ml while chalcone CH2 showed activity against several genera. On the other hand, vanillin inhibited effectively all evaluated pathogens with concentrations lower than 250 µg/ml, but not the iso-vanillin. In relation to commercial products, both have shown inhibitory action against most pathogens evaluated although there were exceptions. It is concluded that plant metabolites such as chalcone CH2 and vanillin can inhibit the growth of the pathogenic fungi evaluated, constituting potential bio-fungicides.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas, a lo largo del tiempo, han debido adaptarse a las condiciones ambientales en las cuales crecían. Dicha adaptación estaba condicionada por factores bióticos y abióticos; he aquí la importancia de que las mismas desarrollaran estrategias físicas, químicas y fisiológicas para poder hacer frente a todo aquello que tienda a modificar su normal desarrollo (Maestro-Duran et al., 1993).

Dentro de los factores bióticos intervinientes se encuentran los hongos. La diversidad fúngica es la resultante de diversas estrategias y mecanismos de variabilidad genética y reproductiva (Agrios, 2005). Las relaciones establecidas entre los hongos y el resto de los integrantes de comunidades y ecosistemas están bajo estudio debido a que cumplen con distintos eco-servicios, lo que agrega valor a su presencia en la ecosfera. Como parte de dichas interacciones, los hongos hemibiótrofos con fases parasíticas y saprofiticas, son agentes biodegradadores muy importantes en el planeta; siendo prácticamente los únicos organismos descomponedores de las moléculas recalcitrantes de celulosa y lignina en los ecosistemas forestales. La producción y acumulación de biomasa en estos ecosistemas están reguladas por macro y micro hongos descomponedores permitiendo continuar el ciclo de los nutrientes atrapados en residuos vegetales y animales, y contribuir con la formación y agregación del suelo (Alexopoulos et al., 1996). Los endófitos, por su parte, establecen una estrecha asociación con los tejidos vegetales aéreos, beneficiando al hospedante con actividad bio-pesticida debida a la producción de alcaloides que se acumulan en la planta, favoreciendo así el crecimiento y mayor resistencia a los factores de estrés abióticos (sequía) y bióticos (nemátodos y patógenos fúngicos) (Udayanga et al., 2011). Los hongos establecen, además, asociaciones simbiótico-mutualistas con autótrofos. Por un lado los líquenes surgen de la asociación de ciertos hongos con micro-autótrofos como ser cianobacterias, clorófitas y/o algas azules; mientras que las micorrizas son el resultado de una interacción fúngica con las raíces de las plantas (Curtis, 2008). Estas últimas pueden interactuar a nivel de la rizosfera, filosfera, filoplano, caulosfera y gemisfera de las plantas, siendo de importancia vital para el mantenimiento vegetal y de todo el ecosistema. Las endomicorrizas, también

conocidas como arbusculares, favorecen principalmente la captación de nutrientes particularmente el fósforo y nitrógeno, protegiendo a las plantas de patógenos radiculares (Frioni, 2011). Por otro lado, existen hongos patógenos que son capaces de desarrollar enfermedades en distintos hospedantes en distintos momentos de su ciclo biológico (Alexopoulos et al., 2005). La importancia de poder controlarlos reside en que las patologías que generan no sólo afectan a las producciones desde el punto económico sino que además suelen ser nocivas para la salud humana y animal.

Los hongos, tal lo plantean Grayer y Harbone (1994), para ser efectivos en su etapa patogénica requieren que sus esporas germinen y sean capaces de superar las barreras defensivas vegetales (cutícula) y, una vez atravesadas, poder infectar los tejidos de la planta. Estas barreras son físicas y/o químicas y, dentro de estas últimas, se encuentran los compuestos o metabolitos generados por las plantas que expresan capacidad antifúngica. Acorde al trabajo de Lygin et al. (2014), estos metabolitos surgen como una primera línea de defensa ya sea matando al microorganismo o disminuyendo su colonización para que luego otras formas de defensa puedan eliminarlo.

La actividad antimicrobiana puede estar delegada a metabolitos secundarios como son los compuestos fenólicos, saponinas, alcaloides, terpenoides, estibilenos y fenilpropanoides, entre otros, denominados anticipinas (Grayer y Harbone, 1994). La presencia de estos compuestos vegetales antifúngicos se debe a distintas vías metabólicas que se desarrollan permitiendo la funcionalidad de las células de las plantas. Una de las principales formas de producción de estas moléculas es a través de la ruta del ácido shiquímico a partir de la cual los derivados de la glícolisis y la ruta de las pentosas fosfato se reconvierten en aminoácidos aromáticos. Es con estas reacciones que se sintetiza fenilalanina, molécula que al perder su grupo amonio mediante la fenilalanina amonio liasa (PAL) es utilizada como precursora de los compuestos fenólicos dentro de las plantas (Taiz y Zeiger, 2002).

La respuesta a la infección surge como un aumento en la producción de dichos metabolitos alcanzando una concentración inhibitoria del patógeno, ocasionalmente denominadas como fitoalexinas (Agrios, 2005). Según García y Pérez (2003), la respuesta vegetal es impulsada por uno o varios “elicitores”, que

son aquellos compuestos que inducen la síntesis de metabolitos antifúngicos. Si bien es necesario un estudio más profundo sobre las formas en que se aumenta la velocidad de síntesis de estos compuestos, para García y Pérez (2003) y Agrios (2005) es importante la transcripción de ARNm y posterior síntesis de enzimas involucrada en la síntesis de estos metabolitos para que la respuesta vegetal antifúngica se desarrolle.

Tal lo expresa García (2004), estos metabolitos son eficaces desde la ecología, lo que los diferencia de los metabolitos primarios que son eficaces fisiológicamente. Si a su función ecológica sumamos, como lo plantea Rodríguez Maturino et al. (2015), la ventaja de ser rápidamente degradados en el suelo y que generalmente no presentan un efecto tóxico en mamíferos; los mismos pueden ser empleados en los sistemas de agricultura orgánica y sustentable.

Los primeros reportes sobre la presencia de metabolitos con acción antifúngica fueron descritos por Muller y Borger (1940). Los mismos mostraron fuertes evidencias de la resistencia de las plantas a enfermedades al observar la resistencia de la papa al hongo *Phytophthora infestans* causada por la producción de compuestos fungitóxicos por parte de la planta hospedante (García Mateos y Pérez Leal, 2003).

Según Grayer y Harbone (1994), existen distintas familias botánicas que presentan compuestos antifúngicos los cuales pueden variar en su constitución química dentro de cada familia o bien estar presente parcialmente dentro de las mismas. Para Graham (1991), son los metabolitos derivados de fenilpropanoides los que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y desempeñan distintas funciones. Es de allí la importancia de analizar este tipo de compuestos, donde su biosíntesis puede ser respuesta a la presencia de un patógeno fúngico.

En la Flia. *Fabaceae* según Lozovaya et al. (2004), los fenilpropanoides son sintetizados y acumulados como respuesta al ataque de patógenos. En *Glycine max* se sintetizan isoflavonas como ser daidzeína, genisteína y sus derivados; pero además isoflavonoides como coumestrol y gliceolina (Lozovaya et al., 2004). Más allá de esta especie en particular, otras dentro de esta familia botánica presentan compuestos químicos con potenciales funciones antifúngicas. Por lo tanto el análisis

de varios compuestos permitiría un mejor conocimiento sobre la defensa frente a los patógenos por parte de dicha familia.

Por otro lado, para Carpinella et al. (2003), es necesario prestar atención a la familia *Meliaceae* debido a que ciertos metabolitos potencialmente activos son producidos por árboles de dicha familia, los cuales pueden ser utilizados como compuestos antifúngicos. Este es el caso del árbol *Melia azedarach*, conocido vulgarmente como paraíso, donde según el trabajo de Carpinella et al. (2003) presenta ciertos metabolitos dentro de los extractos vegetales que impiden el desarrollo de patógenos fúngicos.

Más allá de un tipo particular de familia botánica, la presencia de metabolitos secundarios dentro del Reino Vegetal muestra que los mismos proponen distintas formas de contención a la infección y/o colonización de ciertos patógenos. De acuerdo a Yanar et al. (2011), la actividad y los efectos de estos metabolitos vegetales hicieron que fuesen considerados como una estrategia natural y de menor impacto ambiental para controlar patógenos fúngicos asociados a los alimentos y que ponen en riesgo la salud humana y animal.

#### HIPÓTESIS

Ciertos metabolitos secundarios vegetales tienen acción inhibitoria sobre la proliferación de patógenos fúngicos.

#### OBJETIVO

Determinar la acción inhibitoria de metabolitos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de patógenos que actúan en vegetales de interés agronómico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección y Aislamiento de Cepas Fúngicas a ser evaluadas

La tesina se desarrolló en el marco del Proyecto PID.AGR.UNR 287 de la cátedra de Botánica Criptogámica. El set de aislamientos fúngicos evaluados pertenecen a cinco géneros taxonómicos. Cuatro cepas de *Fusarium* y una de *Phomopsis* fueron seleccionadas a partir de la micoteca del área y Fitopatología, disponible en el laboratorio de Biodiversidad Vegetal y Microbiana (BioVyM, IICAR, FCA.UNR). Los mismos son causantes de enfermedades vegetales de interés agronómico y afectan de manera detrimental no sólo la producción y calidad de los alimentos sino también la salud humana y ambiental. Estos patógenos fúngicos fueron reactivados mediante siembras en medio de cultivo de agar papa-glucosa 2% y acidulado con gotas de ácido láctico al 25% (APGA), e incubados en condiciones de oscuridad a 26+/-1 °C durante 7 días hasta la obtención de colonias (Fig. 1).

A dicha selección se incorporaron cuatro nuevos aislamientos patógenos de especies hortícolas de consumo humano, tales como frutos del cultivo de *Cucurbita maxima* var. *maxima* (zapallito), con el fin de evaluar la posibilidad de su control mediante metabolitos vegetales. Ya que este tipo de producción agronómica cuenta con regulaciones para el uso de fungicidas comerciales y lo producido en el campo es ingerido sin procesamiento industrial por los consumidores.

Para ello se procedió a tomar porciones de tejido del área de avance de las lesiones y se desinfectaron superficialmente con lavandina al 1% durante 20 segundos. Se realizaron lavados con agua estéril, luego se orearon y sembraron en placas con medio de cultivo APGA. Se incubaron en condiciones de oscuridad a 26+/-1 °C durante 7 días hasta la obtención de colonias (Fig. 1).

### Caracterización morfológica de Especies Fúngicas Evaluadas

Una vez obtenidas las colonias puras de cada uno de los patógenos bajo estudio y con la finalidad de validar su identidad, se realizó la caracterización en base a atributos o marcadores morfológicos. Esta determinación se logró en base a sus características macro-morfológicas como ser color de las colonias, presencia y forma del estroma, presencia y tipo de picnidios y peritecios; y micro-morfológicas

como tamaño y forma de conidios, ascos y ascosporas (Pioli et al., 1997; 2000; Leslie y Summerell, 2006; Hernández et al., 2015). Además ciertas cepas fúngicas fueron identificadas molecularmente en base a dos técnicas como son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el uso de varios oligonucleóticos (*primers*) de diferente especificidad.

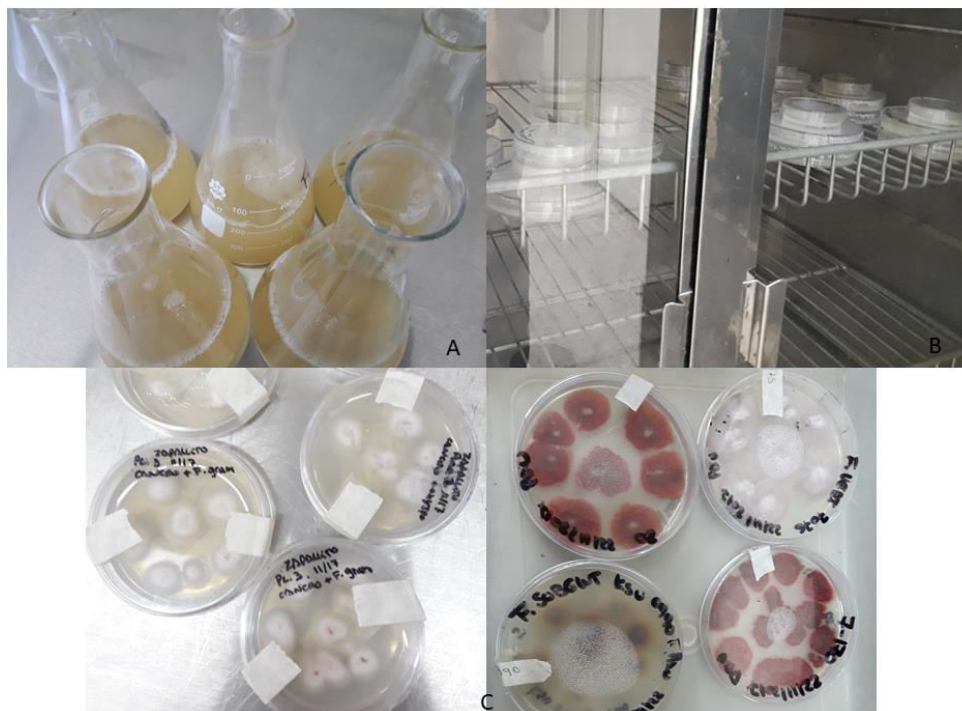


Fig. 1: Obtención de colonias fúngicas. a) Medio de cultivo APGA. b) Incubación en estufa a 27°C. c) Colonias fúngicas.

### Preparación de Inóculos

Los inóculos se prepararon de acuerdo con los lineamientos del documento M38-A2 recomendado por el Instituto Standards de Clínica y Laboratorio (CLSI) de Estados Unidos utilizando suspensiones de conidios. Los hongos fueron sembrados en medio Agar Papa Dextrosa, para estimular la conidiación, y se incubaron a 28°C por 10 días.

Una vez obtenidas colonias maduras, las mismas se cubrieron con 10ml de agua destilada estéril y se rasparon para obtener una suspensión densa que fue transferida a un tubo estéril. La solución fue removida por medio de un vortex por unos 3-5 minutos. Posteriormente se dejó reposar esta suspensión por 5 a 7 min

para permitir la sedimentación de los fragmentos más pesados y se separó la fracción superior. Esta última fracción se homogeneizó y se llevó al recuento de conidios en cámara de Neubauer (Svetaz et al., 2004) (Fig. 2).

Una vez obtenido el recuento, se realizó la dilución necesaria para obtener una concentración de  $5 \times 10^3$  UFC/mL (Leslie y Summerell, 2006).

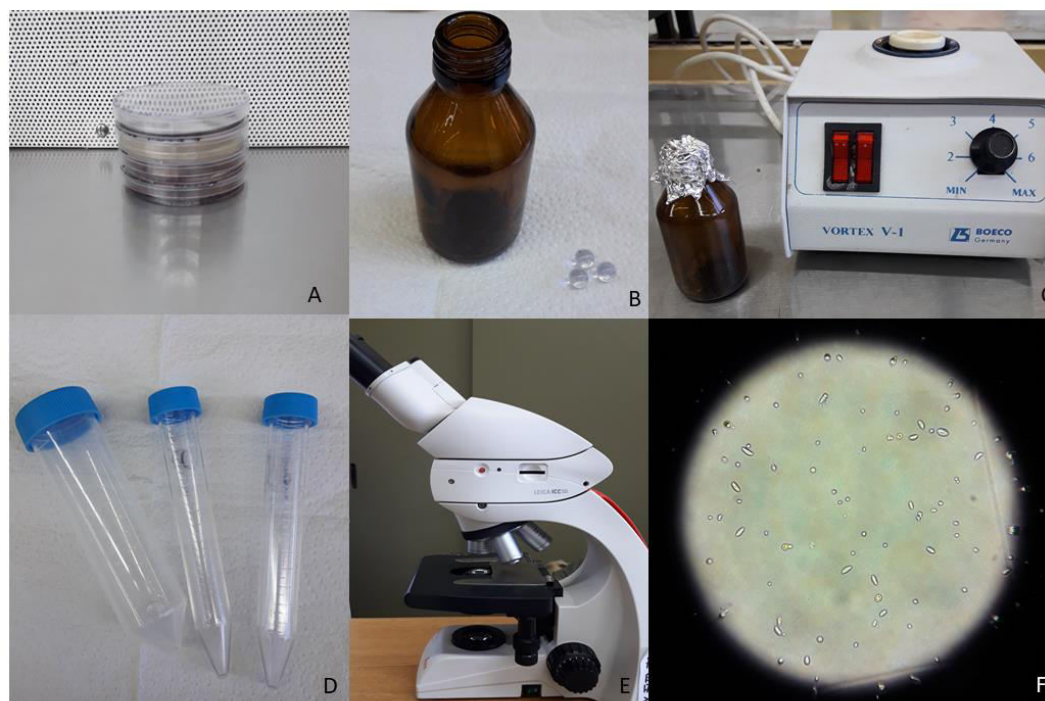


Fig. 2: Preparación de Inóculos. a) Cajas de Petri con material fúngico. b) Frascos con perlitas de vidrios para agitar. c) Uso de vortex para homogeneizar la solución fúngica. d) Tubos Falcon para cada inoculo. e) y f) Utilización de microscopio con cámara de Neubauer para recuento de conidios.

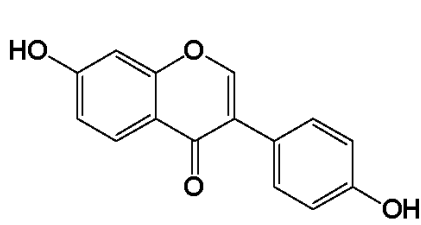
### Compuestos a Evaluar

Se trabajó con compuestos de origen vegetal pero sintetizados por el Laboratorio Sigma- Aldrich, y tal lo expresa la bibliografía pertenecen a diferentes Familias Botánicas, entre ellas, la Familia *Meliaceae* y *Fabaceae* (Carpinella et al., 2003; Lozovaya et al., 2004; Pioli et al., 2004). Además se analizó la actividad antifúngica de compuestos sintéticos y comerciales.

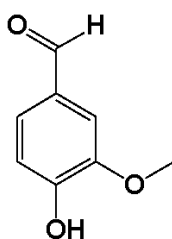
Los compuestos de origen vegetales a evaluar fueron:

- Daidzeína (Lozovaya et al., 2004; Pioli et al., 2004)
- Genisteína (Lozovaya et al., 2004; Pioli et al., 2004)
- Vainillina: 3 metoxi- 4 hidroxibenzaldehído (Carpinella et al., 2003)
- Iso-vainillina: 4 metoxi- 3 hidroxibenzaldehído.
- Chalcona 1: 2',3',4'-trimetoxi- 1,3-difenil- 2 propen- 1 ona
- Chalcona 2: 1,3-difenil- 2 propen- 1 ona

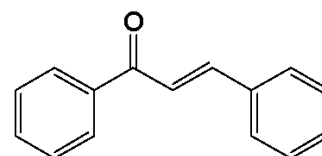
A continuación se presentan las estructuras químicas de los compuestos vegetales a analizar esquematizadas con el programa ChemBioDraw Ultra 12.0:



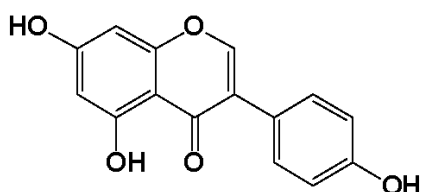
daidzeína



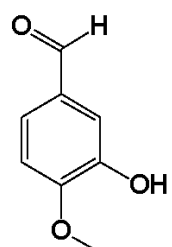
vainillina



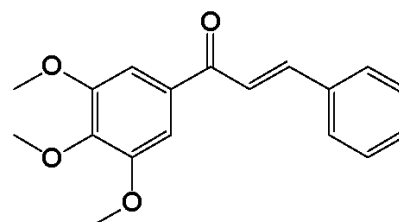
chalcona 1



genisteína



isovainillina



chalcona 2

Además se utilizaron como testigos dos fungicidas comerciales Azoxytrobina (estrobirulina) + ciproconazole (triazol) y Carbendazim 50, de baja toxicidad (grado 3 Banda azul o Banda verde) por ser catalogados los menos tóxicos para la salud humana y el ambiente (INTA, 2008).

Para realizar el análisis, los distintos compuestos químicos puros naturales y sintéticos fueron disueltos en solvente DMSO para lograr una concentración de 12,5 mg/ml (Zacchino y Gupta, 2007). Con respecto a los productos comerciales, los

mismos fueron disueltos en agua debido a su mayor solubilidad en la misma (Zacchino y Gupta, 2007). De esta manera se obtuvieron las distintas soluciones madres de trabajo.

### Actividad antifúngica

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de cada compuesto químico se determinó usando el método de micro-dilución en caldo en microplacas de 96 pocillos con tapa y fondo plano (GreinerBioOne, Wemmel, Bélgica), con la modificación de que el medio utilizado fue Sabouraud-Glucosa (Sb-Glu). La CIM, se define como la menor concentración de un compuesto en la que se inhibe totalmente el desarrollo de las colonias de microorganismos fúngicos. En el caso de compuestos puros se consideraron activos aquellos que registran valores de CIM < 250 µg/ml (Svetaz et al., 2004; Zacchino y Gupta, 2007; Sortino et al., 2011).

A partir de las soluciones madres de los distintos compuestos se prepararon soluciones de trabajo en medio de cultivo Sb-Glu. En las microplacas se procedió a realizar diluciones seriadas para obtener las siguientes concentraciones: 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,80; 3,90; 1,95; 0,98; 0,49; 0,24 µg/ml. Cada uno de los pocillos presentó un volumen final de 100ul y se realizaron dos repeticiones por cada compuesto evaluado (Sortino et al., 2011) (Fig. 3).

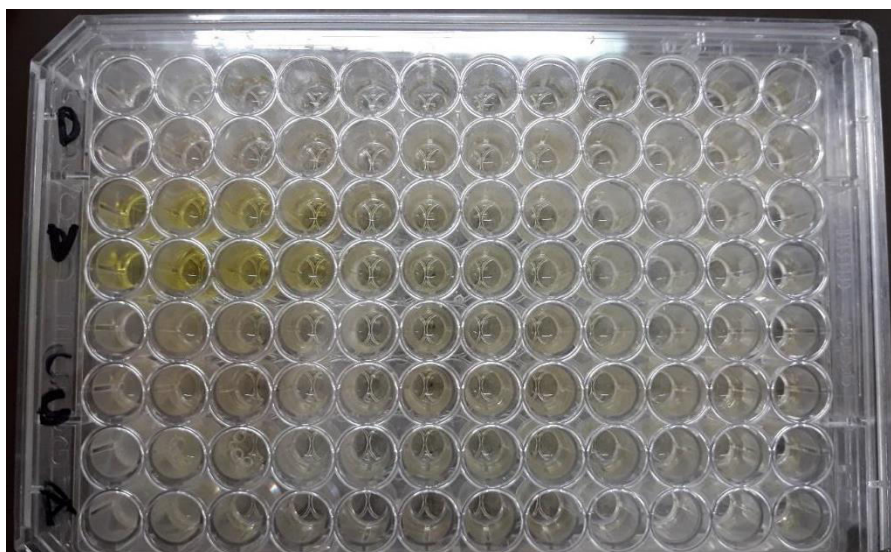


Fig. 3: Placa de 96 pocillos preparada con medio de cultivo y distintas concentraciones de los compuestos a evaluar.

Posteriormente, se agregó 100  $\mu$ l de suspensión de inóculo de cada una de las especies fúngicas evaluadas, las cuales fueron puestas en contacto con los potenciales compuestos antifúngicos. Previamente, se realizó un control de viabilidad del hongo colocando al mismo en medio de cultivo libre de los compuestos a evaluar. Las placas se incubaron a 28-30°C utilizando cámara húmeda por un tiempo de 2 a 5 días dependiendo de la especie fúngica.

Además se determinó la Concentración fungicida mínima (CFM), que se define como la mínima concentración del compuesto antifúngico necesario para provocar la muerte (efecto fungicida) de la mayoría de los microorganismos fúngicos viables (Zacchino y Gupta, 2007). Para ello, se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ L de aquellos pocillos en los que no se observó desarrollo fúngico y se sembraron en placas de Petri con Sb-Agar. Luego de la incubación por 2-5 días a 28°C, se observó el crecimiento y se determinó la CFM. Cada determinación fue realizada por duplicado (dos filas de 12 pocillos cada una) en la misma placa (Badaracco et al., 2018).

## RESULTADOS

### Selección y Aislamiento de Cepas Fúngicas a ser evaluadas

La Tabla 1 presenta las cepas fúngicas obtenidas de diversas especies botánicas hospedantes y ecosistemas agrícolas y hortícolas (periurbanos), seleccionadas para incluir en el presente estudio.

**Tabla 1: Resumen de aislamientos validados en su identidad por marcadores morfológicos y moleculares**

<b>Aislamientos fúngicos</b>	<b>Origen de recolección Hospedante y localidad</b>
<i>Alternaria</i> sp <sup>a</sup>	zapallito- RosarioSanta Fe
<i>Cladosporium</i> sp <sup>a</sup>	zapallito-RosarioSanta Fe
<i>F. graminearum</i> 1 CE-135 <sup>a,b,c</sup>	Trigo-Zavalla Santa Fe
<i>F. graminearum</i> 2 CE-170 <sup>a,b,c</sup>	Soja-Arrecifes Buenos Aires
<i>F. oxysporum</i> <sup>a</sup>	zapallito-RosarioSanta Fe
<i>F. proliferatum</i> MRC <sup>mrc</sup>	Micoteca F-RC
<i>F. subglutinans</i> MRC <sup>a</sup>	Micoteca F-RC
<i>Phomopsis longicolla</i> 227 B2 <sup>a,b,c</sup>	soja-IbarluceaSanta Fe
<i>Rhizopus stolonifer</i> <sup>a</sup>	zapallito-RosarioSanta Fe

Validación de identidad fúngica por <sup>a)</sup> caracterización morfológica (2018), <sup>b)</sup> mediante marcadores moleculares (RAPDs) y específicos (2007-2016), <sup>c)</sup> secuenciación (2018), <sup>mrc</sup> Aislamiento codificado de la Micoteca de Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Caracterización morfológica de aislamientos fúngicos para Validación y Determinación de Identidad

***Alternaria* sp. (Ness)**

Macro-morfología: colonias de color verde oscuro y/o verde grisáceo, algodonoso (Fig. 4).

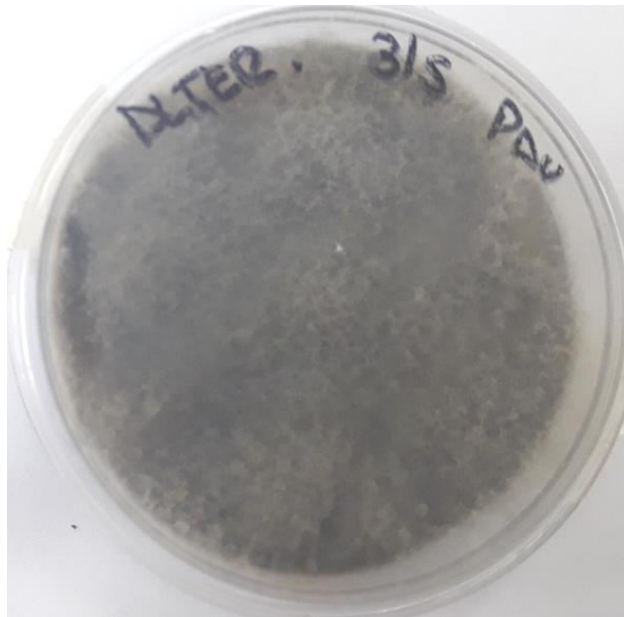


Fig. 4: Macro-morfología de colonia de *Alternaria* sp.

Micro-morfología: Según Barnett y Hunter (1998), se presentan conidióforos oscuros, normalmente simples, de crecimiento determinado o simpodial, cortos o elongados.

Conidios marrones oliváceos con septos longitudinales y transversales, de formas variables, frecuentemente en forma de botella. Los conidios nacen en un apéndice apical simple o ramificado y forman cadenas (Fig. 5).

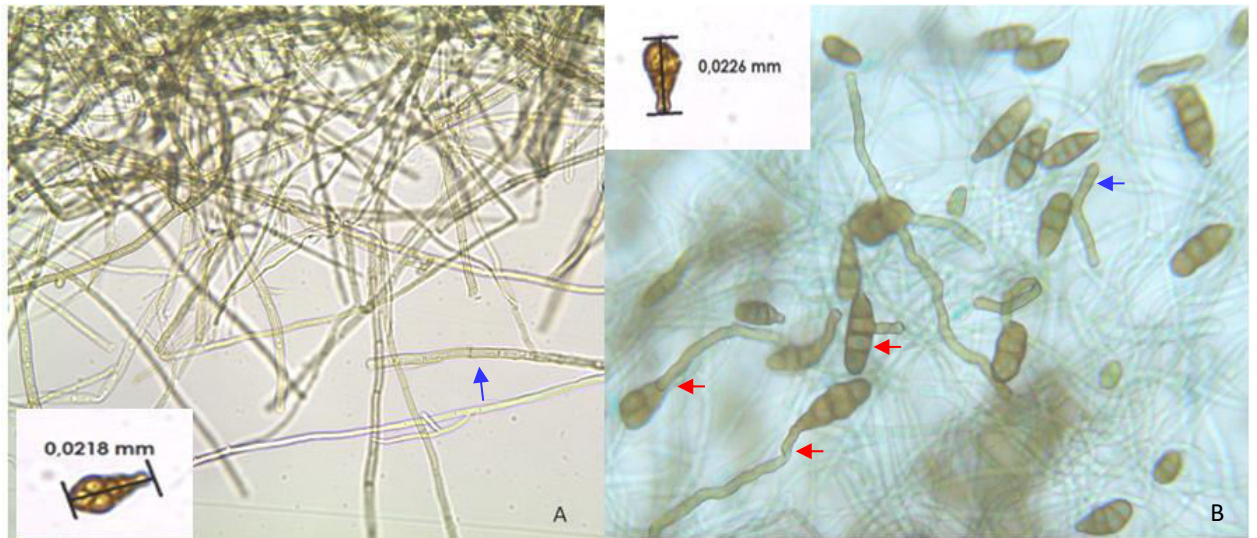


Fig. 5: Micro- morfología de *Alternaria* sp. A: Hifas y conidióforos (flecha azul). B: Conidios y conidios germinados (flecha en rojo).Recuadros: Conidios con septas horizontales y ocasionalmente longitudinales (~21,8 a 22,6 $\mu$ ) (400X).

### ***Cladosporium* sp. (Link)**

Macro-morfología: colonias de color verde oscuro, glabro, usualmente de límites netos e impermeable al agua (Fig. 6).

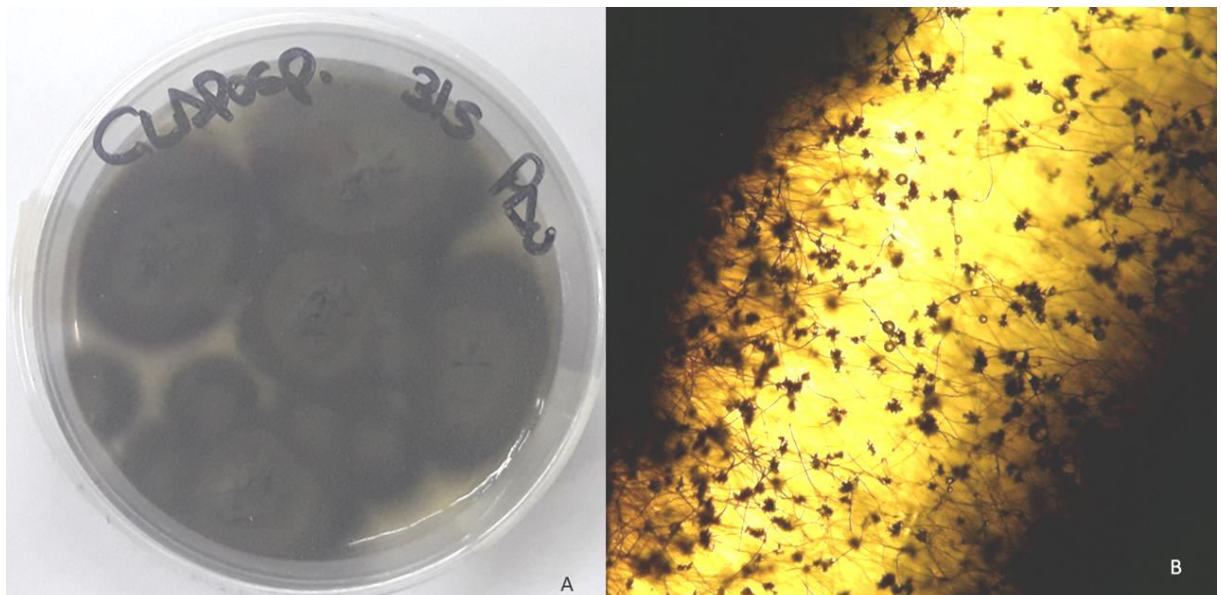


Fig. 6: Macro-morfología de *Cladosporium* sp. A: colonia. B: Imagen en lupa (40X) de conidióforos y conidios.

Micro-morfología: Según Barnett y Hunter (1998), se presenta conidióforos altos, verticales, agrupados o solitarios de longitud variable. Conidios claros, de una o dos células, variables en tamaño y forma, normalmente en cadenas simples o ramificadas (Fig.7).

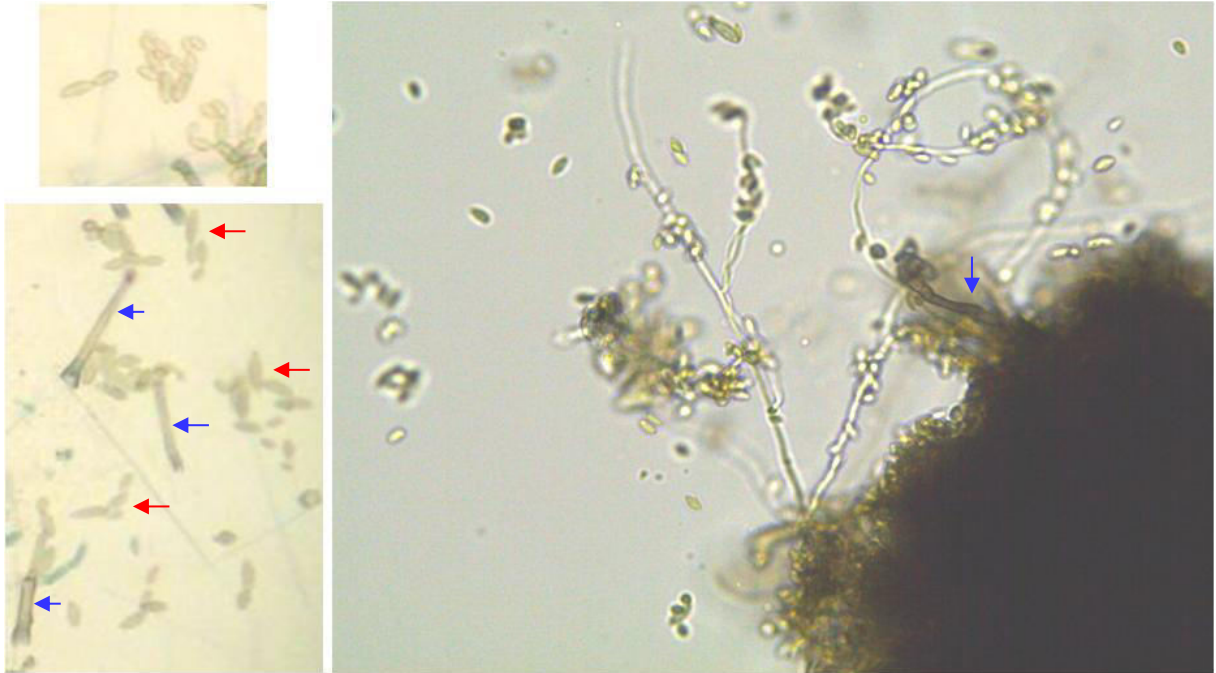


Fig. 7: Micro-morfología de *Cladosporium* sp.: Conidióforos (flecha en azul) y conidios libres de diversas formas (flecha en rojo), típicos de *Cladosporium* (400X).

### ***Fusarium graminearum*** (Schwabe)

Macro-morfología: colonias de color rojo oscuro y de rápido crecimiento. El micelio denso, extensivo y algodonoso (Leslie y Summerell, 2006).

Micro-morfología: Según Leslie y Summerell (2006), conidióforos variables, medianamente cortos. Macroconidios esbeltos, alargados, hialinos, levemente curvados, normalmente reunidos en esporodoquios. No presenta microconidios.

### ***Fusarium graminearum***1 (Schwabe) CE-135

Macro-morfología: El aislamiento CE-135 presenta micelio rojizo intenso con tintes amarillos (Fig. 9).

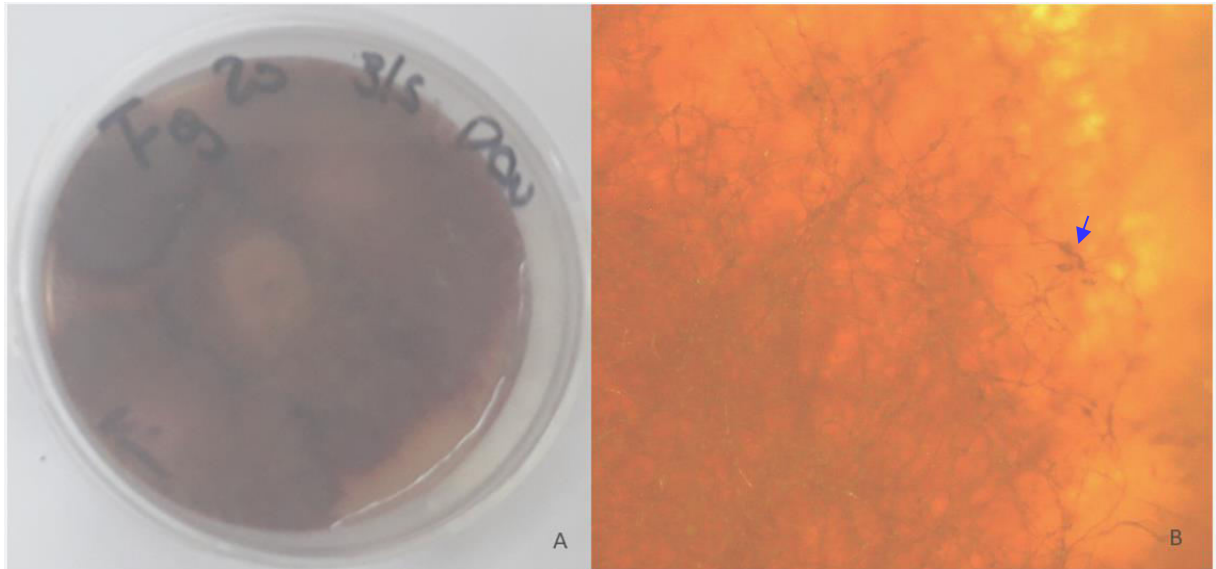


Fig. 9: Macro-morfología de *Fusarium graminearum*1 CE-135. A: Colonia. B: Imagen de lupa (40x) de micelio y esporodoquios (flecha azul).

Micro-morfología: el aislamiento CE-135 presenta macroconidios de 0,034mm ~ 34 $\mu$  con 3-5 septos (Fig. 11).



Fig. 11: Micro-morfología de *Fusarium graminearum*1 CE-135. A y B: Imagen de macroconidios de Leslie y Summerell (2006). C: Hifas (400x). D: Esporodoquio y macroconidios (400x).

### ***Fusarium graminearum* 2 (Schwabe) CE170**

El aislamiento CE-170 presenta coloración rojizo-carmín intenso (oscuro) (Fig. 8)

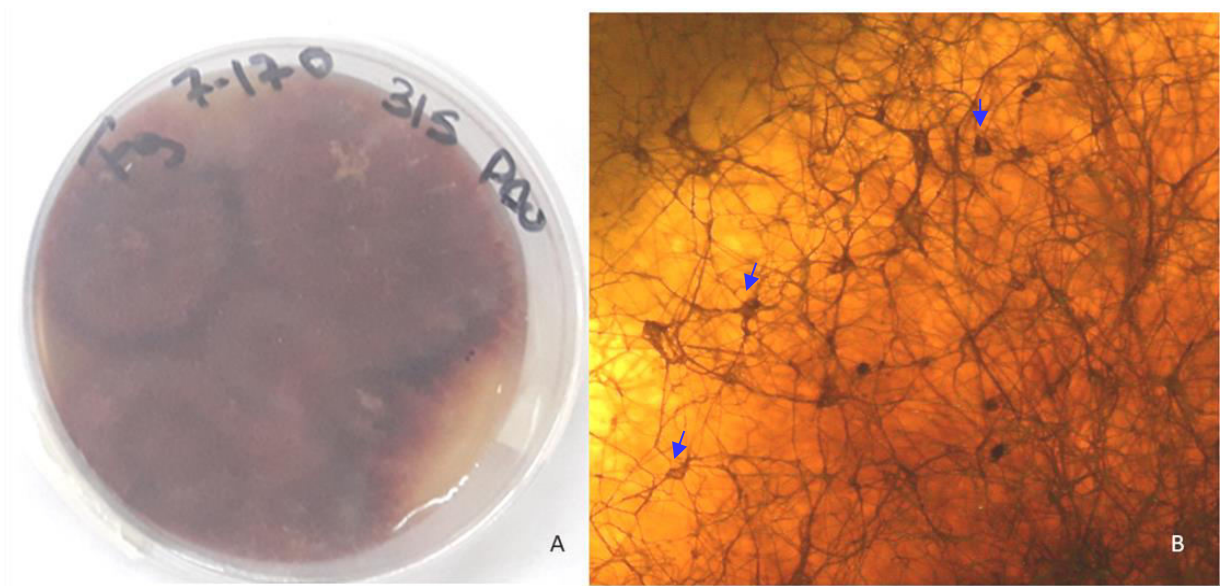


Fig. 8: Macro-morfología de *Fusarium graminearum* 2 CE-170. A: Colonia. B: Imagen con lupa (40x) de esporodocios.

Micro-morfología: el aislamiento CE-170 cuenta con macroconidios de tamaño aproximado de 0,037mm con 3-5 septos (Fig. 10).



Fig. 10: Micro-morfología de *Fusarium graminearum* 2 CE-170. A y B: Imagen de macroconidios de Leslie y Summerell (2006). C: Hifas (400x). D: Macroconidios (400x).

***Fusarium oxysporum*** (emend. Snyder y Hansen)

Macro-morfología: Según Leslie y Summerell (2006), las colonias son blanquecinas y violáceas al centro. El micelio es extensivo (Fig. 12).



Fig. 12: Macro-morfología de *Fusarium oxysporum*. A: Colonia.

Micro-morfología: Puede existir o no esporodoquios. Macroconidios alargados, hialinos, rectos o levemente curvados, de pared delgada, tamaño aproximado de  $0,018\text{mm} \sim 18\mu$ . Presenta microconidios unicelulares, ovoides, sin septos, agrupados en cabezuelas. Presencia de clamidosporas individuales (Fig. 13).

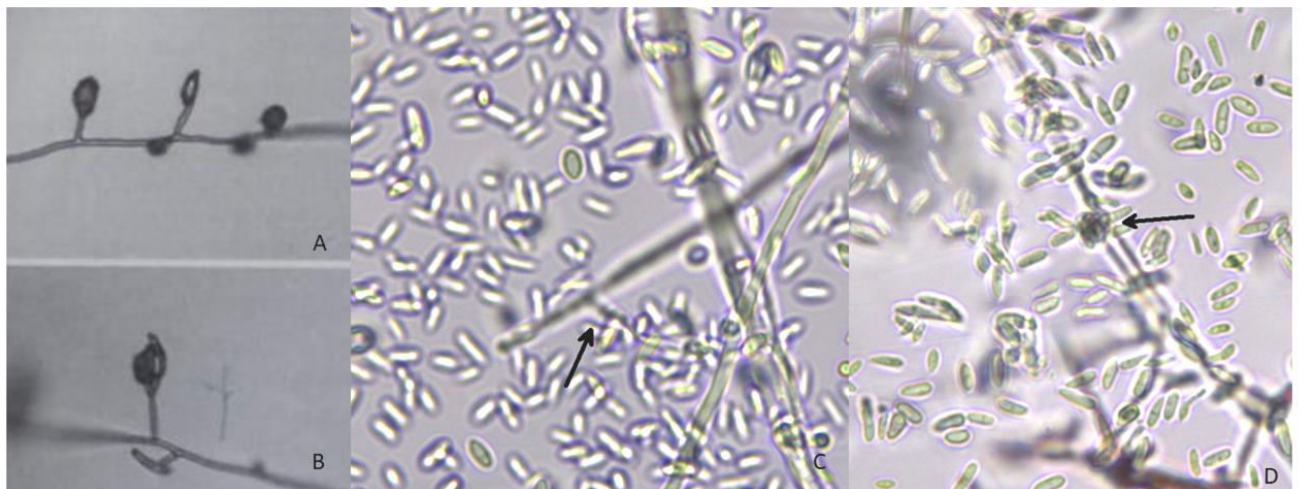


Fig. 13: Micro-morfología de *Fusarium oxysporum*. A y B: Imagen de fiálides y cabezuelas de Leslie y Summerell (2006). C: Fiálide corta señalada (400x). D: Microconidios agrupados en cabezuela señalados (vista desde arriba) (400x).

***Fusarium proliferatum*** (Matsushima, Nirenberg)

Macro-morfología: Para Leslie y Summerell (2006), el micelio es inicialmente blanco y luego lila-violeta. Esporodocios discretos o cercano a los bordes de las colonias. Presencia de pigmentos violetas. En algunos preparados, pionnotes azules o negros (que ocasionalmente lucen similares a esclerocios) (Fig. 14).

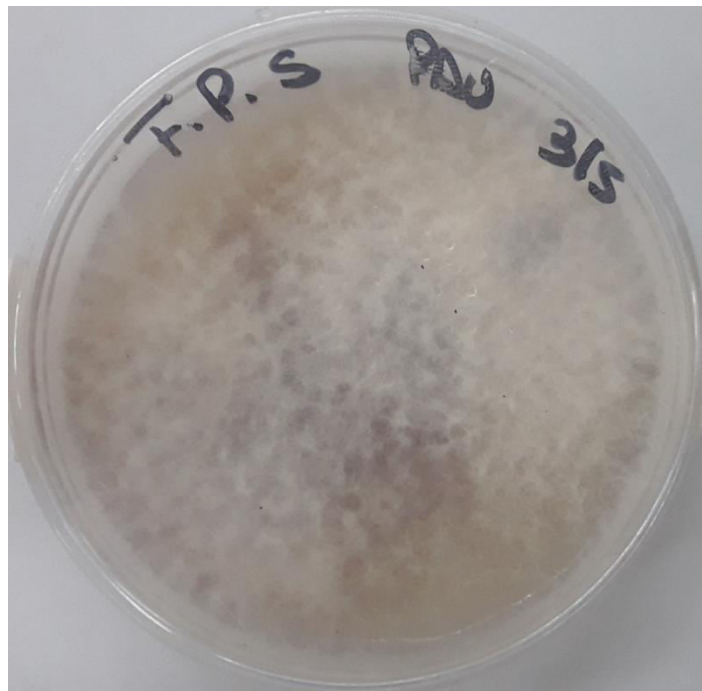


Fig. 14: Macro-morfología de *Fusarium proliferatum*. A: colonia.

Micro-morfología: Conidióforos variables, medianamente corto. Macroconidios esbeltos, de pared delgada, alargados, hialinos, levemente curvados, miden aproximadamente  $0,017\text{mm} \sim 17\mu$ . Presenta 3-5 septos.

Microconidios pequeños de alrededor de  $0,009\text{mm} \sim 9\mu$ , presentan una base aplanada y no hay septos, pueden estar agrupados en cadenas de largo variable, presenta falsas cabezas o agregados (Leslie y Summerell, 2006) (Fig. 15).

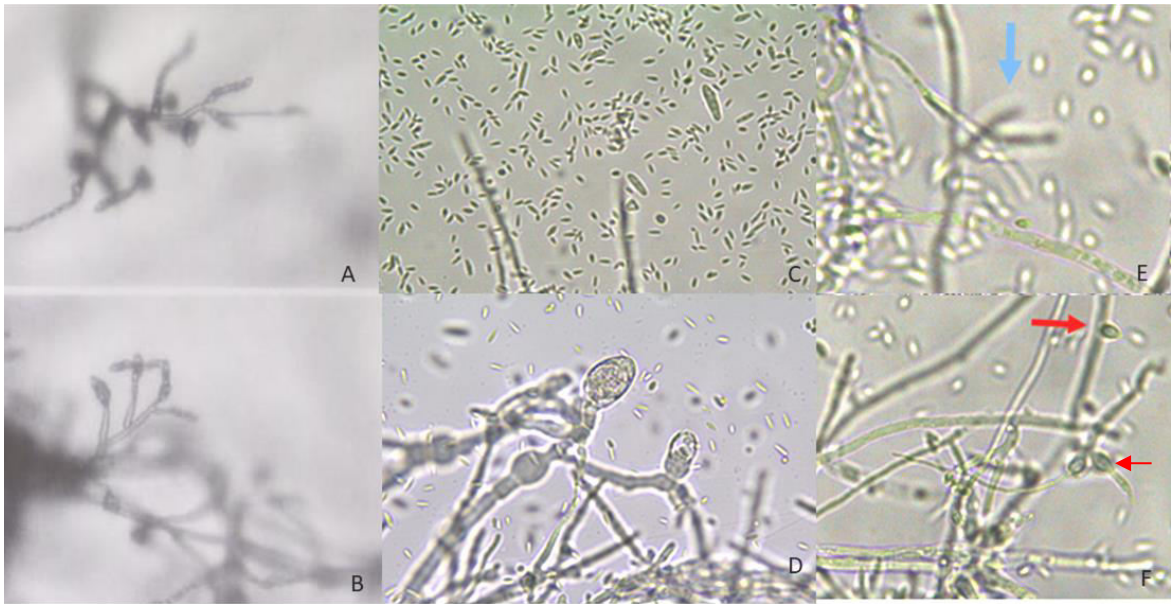


Fig. 15: Micro-morfología de *Fusarium proliferatum*. A y B: Imagen de fiálides y conidios en cabezuelas y pequeñas cadenas de Leslie y Summerell (2006). C: macroconidios y microconidios (400x). D: Presencia de clamidosporas (400x). E: Visualización de fiálides bífidas (flecha azul) (400x). F: Visualización de monofiálides cortas y micro-conidios en cabezuelas en vista superior (Flecha roja) y otros libres a partir de las pequeñas cadenas (400x).

***Fusarium subglutinans*** (Wollenweber y Reinking; Nelson, Toussoun y Marasas)

Macro-morfología: Abundante micelio en principio blanco y luego violeta. Pigmentación violeta a negro. Posible presencia de esclerotos (Leslie y Summerell, 2006) (Fig. 16).

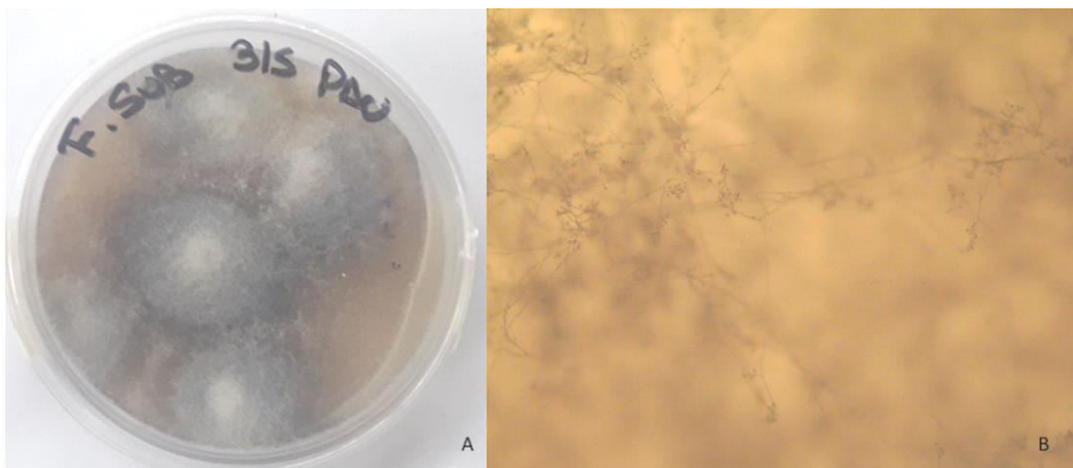


Fig. 16: Macro-morfología de *Fusarium subglutinans*. A: Colonia. B: Imagen de lupa (40X) de esporodoquios.

Micro-morfología: Según Leslie y Summerell (2006) conidióforos variables, medianamente corto.

Macroconidios relativamente esbeltos, ligeramente falcadas y de pared fina, midiendo aproximadamente 0,015mm, presentan usualmente 3 septos.

Microconidios ovalados y sin septos, se presentan cabezas falsas con mucílagos y no por conexión directa con otras esporas, son abundantes y miden alrededor de 0,010mm (Fig. 17).

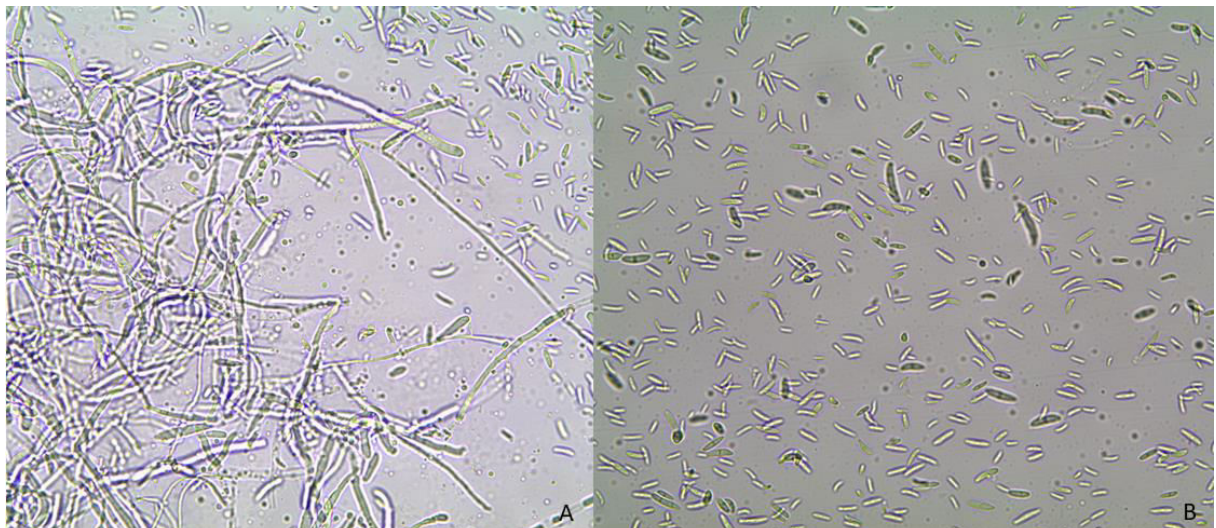


Fig. 17: Micro-morfología de *Fusarium subglutinans*. A: Hifas (400X). B: Variedad de microconidios y macroconidios (400X).

### ***Phomopsis longicolla* - cód. 227 B2 (Sacc)**

Macro-morfología: Según Barnett y Hunter (1998), las colonias son blancas aunque puede cambiar con el paso de las semanas, tornándose a una colonia con tintes grisáceos. Los picnidios, de aspecto costroso e irregular, se desarrollaron agrupados y de color negro (Fig. 18).

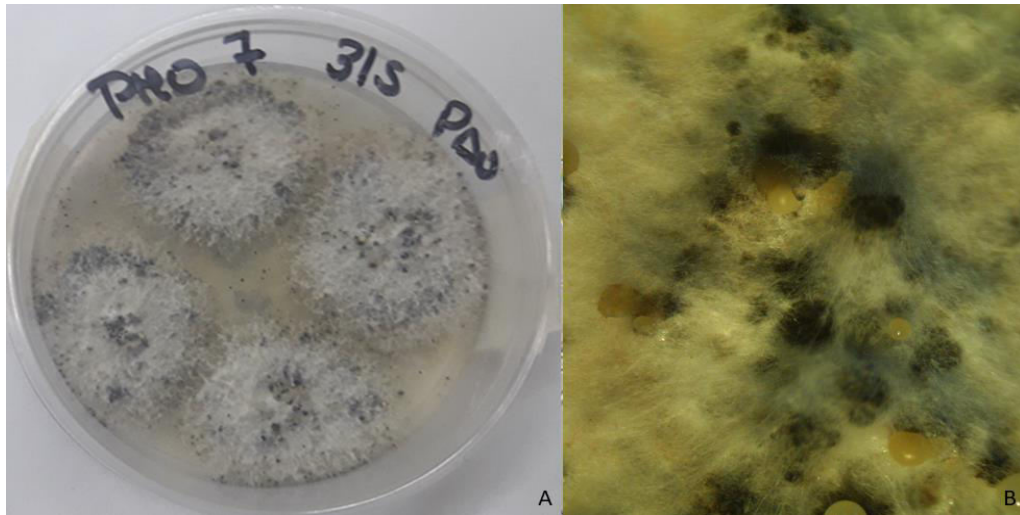


Fig. 18: Macro-morfología de *Phomopsis longicolla* 227. A: Colonia. B: Imagen de lupa (10X) de picnidios maduros exudando gútulas con conidios.

Micro-morfología: Conidios alfa hialinos, ovoides, pequeños. Los peritecios de la fase teleomorfa no han sido observados ni descritos hasta el momento (Fig. 19).



Fig. 19: Micro-morfología de *Phomopsis longicolla* 227. A: Hifas (400X). B: alfa conidios hialinos y bigutulados típicos de *P. longicolla* (1000X).

### ***Rhizopus stolonifer* (Ehnerb)**

Macro-morfología: Colonias blancas en los primeros días y luego grisáceas (Fig. 20).



Fig. 20: Macro-morfología de *Rhizopus stolonifer*. A: Colonia

Micro-morfología: micelio de rápido crecimiento, hialino cuando es joven luego se torna gris oscuro. Presencia de hifas cenocíticas.

Esporangióforos alargados que culminan en esporangios de gran tamaño. Esporas pequeñas de coloración marrón claro (Fig. 21).

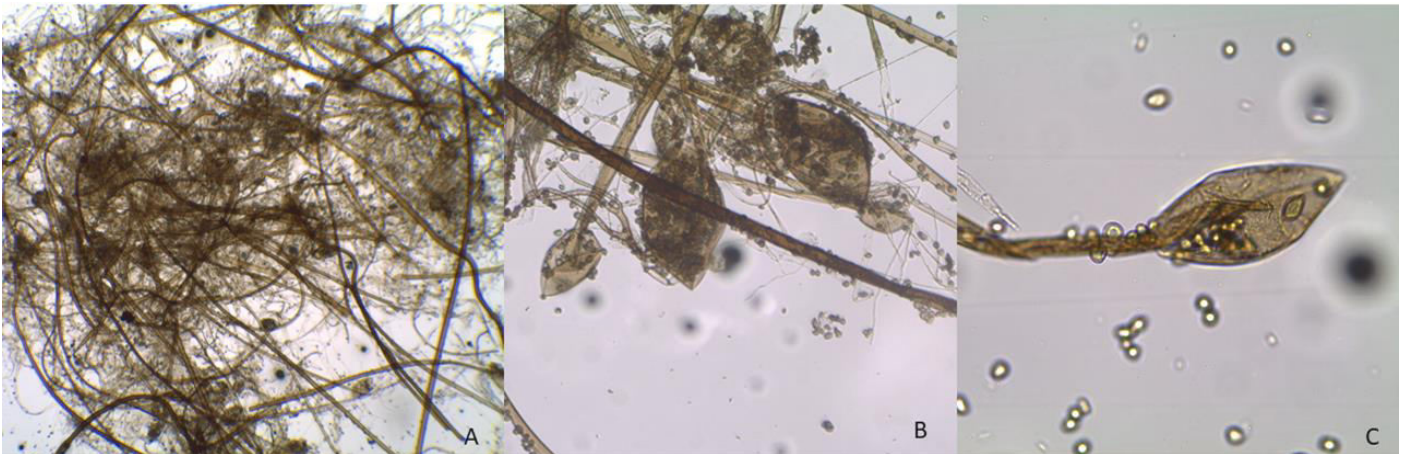


Fig. 21: Micro-morfología de *Rhizopus stolonifer*. A: Hifas (400x). B: Esporangióforos y esporangios (400x). C: Esporangio abierto con esporas (400x).

### Actividad Antifúngica

Posterior a la siembra e incubación de cada especie fúngica en microplacas de 96 pocillos (Fig. 22), se observó cual era la relación entre el patógeno y los distintos compuestos antifúngicos bajo estudio.

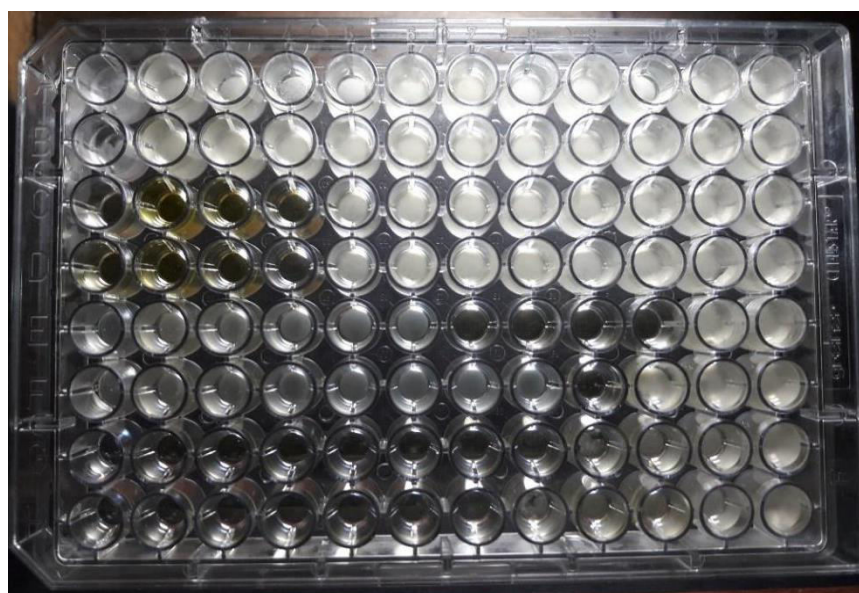


Fig. 22: Placa de resultados de *F. subglutinans*.

De acuerdo a los resultados de la Tabla 2, dos de los seis compuestos evaluados, la vainillina y la chalcona 2 mostraron efecto inhibitor (CIM < 250 µg/ml) y/o bio-fungicida (CFM < 250 µg/ml) frente a una parte o la totalidad de los nueve aislamientos fúngicos evaluados.

La vainillina inhibió de manera efectiva (CIM= 15,6 a 62,5 µg/ml) y con acción fungicida (CFM= 31,3 a 62,5 µg/ml) frente a los 9 aislamientos evaluados: *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *R. stolonifer*, *P. longicolla*, 3 especies de *Fusarium* (*F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. oxysporum*) y 2 cepas de *F. graminearum* (CE-170 y CE-135) (Tabla 2).

Es relevante destacar que este compuesto vegetal mostró la mayor efectividad inhibitoria frente a *F. proliferatum* registrando el menor valor de CIM= 15,6 µg/ml. Asimismo, las CIM obtenidas al reaccionar con *Cladosporium* sp., *R. stolonifer*, *F. subglutinans*, *P. longicolla* y la cepa CE-135 de *F. graminearum* fueron de 31,3 µg/ml; mientras que frente a la cepa CE-170 de *F. graminearum*, *F. oxysporum* y *Alternaria* sp., la CIM fue de 62,5 µg/ml (Tabla 2).

Además de inhibir la formación de colonias, la vainillina mostró acción fungicida sobre los patógenos estudiados, registrando el menor valor de CFM= 31,3 µg/ml específicamente frente a cuatro aislamientos fúngicos como *Cladosporium* sp., *R. stolonifer*, *P. longicolla* y *F. subglutinans* (Tabla 2). De esta manera y mediante los resultados se verifica la potencialidad de dicho compuesto como bio-fungicida.

La iso-vainillina, isómero sintético de la vainillina, contrariamente no presentó acción inhibitoria en el desarrollo de las colonias fúngicas de las cepas estudiadas, excepto en el caso de *Alternaria* sp., a la cual inhibió en una concentración de CIM= 250 µg/ml. Asimismo, no registró acción bio-fungicida tal lo demuestran los valores de CFM > 250 µg/ml (Tabla 2).

Las chalconas sintéticas estudiadas presentaron comportamientos diferentes. La Chalcona 2 se caracterizó por inhibir a *Alternaria* sp., *P. longicolla* y *F. proliferatum* en concentraciones de CIM= 62,5 µg/ml mientras que frente a *F. subglutinans* lo hizo con valores de CIM= 125 µg/ml (Tabla 2). Respecto a su actividad fungicida, este compuesto sólo fue efectivo sobre *Alternaria* sp. y *P. longicolla* en concentraciones de CFM de 125 y 250 µg/ml, respectivamente, ya que al repicar el resto de las cepas a nuevas placas con medio, se originaron colonias. La Chalcona 1, por su parte, no ha desarrollado actividad inhibitoria ni fungicida para los hongos analizados (Tabla 2).

Por su parte, los compuestos naturales daidzeína y genisteína no mostraron acción inhibitoria ni fungicida (Tabla 2) sobre las cepas fúngicas en estudio en ninguna de las concentraciones estudiadas (CIM > 250 µg/ml). Por lo tanto estos compuestos vegetales provenientes de la familia *Fabaceae* no han controlado la formación de colonias de los géneros y especies fúngicas evaluados bajo estas condiciones experimentales.

Cuando se analizó la acción inhibitoria y/o antifúngica de dos principios activos comerciales incluidos como controles experimentales, se observó que varían en su capacidad para inhibir o eliminar patógenos fúngicos.

El carbendazim 50 ha tenido un accionar inhibitorio variable frente a las distintas especies, mientras inhibió de manera contundente el crecimiento de *P. longicolla*, *F. subglutinans* y *F. oxysporum* con valores de CIM < 2 µg/ml (CIM= 0,24; 0,98 y 1,95 µg/ml, respectivamente), no fue efectivo para controlar el crecimiento de las cepas CE-170 y CE-135 de *F. graminearum*, *F. proliferatum* y *R. stolonifer* (CIM > 250 µg/ml) (Tabla 2). En el caso de *Cladosporium* sp., sólo la concentración de CIM=250 µg/ml fue capaz de inhibir el crecimiento fúngico. Al analizar la capacidad fungicida, este compuesto obtuvo valores de CFM similares a los respectivos CIM para *P. longicolla* y *F. subglutinans*, mientras que la CFM fue de 250 µg/ml para *F. oxysporum* (Tabla 2).

La azoxistrobina, principio activo de Azoxy Pro, inhibió el crecimiento fúngico en concentraciones disímiles variando desde una CIM de 250 µg/ml para *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp. y *F. oxysporum*, a valores de CIM que variaron entre 0,98 y 125 µg/ml frente a las otras seis cepas fúngicas (Tabla 2). El menor valor de CIM (CIM= 0,98µg/ml) se obtuvo para *P. longicolla* seguido por una CIM= 1,95 µg/ml para *R. stolonifer* y *F. subglutinans*. Por su parte, las cepas de *F. graminearum* presentaron diferente CIM frente al compuesto bajo estudio, siendo la CIM=125µg/ml y CIM= 7,8µg/ml para la cepa CE- 135 y CE-170 respectivamente.

En este contexto es oportuno destacar, además, que la azoxistrobina frente a *R. stolonifer*, *P. longicolla* y la cepa CE-170 de *F. graminearum*, registró efecto fungicida con CFM= 15,6; 3,9 y 31,3 µg/ml, respectivamente. Pero además se obtuvieron valores semejantes de CIM y CFM para la cepa CE-135 de *F. graminearum* y *Cladosporium* sp. (Tabla 2). Por otro lado, si bien la azoxistrobina ha sido capaz de inhibir el crecimiento de colonias de *Alternaria* sp., *F. proliferatum* y *F. oxysporum* en diferente grado, no ejerció acción fungicida (CFM> 250 µg/ml) sobre ellas.

**Tabla 2: Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) en µg/ml**

	Daidzeína		Genisteína		Vainillina		Isovainillina		CH 1		CH 2		Carbendazim		Azoxistrobina	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Cl</i>	>250	>250	>250	>250	31,3	31,3	>250	>250	>250	>250	>250	>250	250	250	250	250
<i>Alt</i>	>250	>250	>250	>250	62,5	62,5	250	>250	>250	>250	62,5	125	125	>250	250	>250
<i>Rhi</i>	>250	>250	>250	>250	31,3	31,3	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	1,95	15,6
<i>Pho</i>	>250	>250	>250	>250	31,3	31,3	>250	>250	>250	>250	62,5	250	0,24	1,95	0,98	3,9
<i>Fg1</i>	>250	>250	>250	>250	31,3	62,5	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	125	125
<i>Fg2</i>	>250	>250	>250	>250	62,5	62,5	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	7,8	31,3
<i>F sub</i>	>250	>250	>250	>250	31,3	31,3	>250	>250	>250	>250	125	>250	0,98	0,98	1,95	250
<i>F prol</i>	>250	>250	>250	>250	15,6	62,5	>250	>250	>250	>250	62,5	>250	>250	>250	15,6	>250
<i>F oxy</i>	>250	>250	>250	>250	62,5	62,5	>250	>250	>250	>250	>250	>250	1,95	250	250	>250

*Cl*: *Cladosporium* sp; *Alt*: *Alternaria* sp; *Rhi*: *Rhizopus stolonifer*; *Pho*: *Phomopsis longicolla*; *Fg 1*: *Fusarium graminearum* CE-135; *Fg 2*: *Fusarium graminearum* CE-170; *F sub*: *Fusarium subglutinans*; *F prol*: *Fusarium proliferatum*; *F oxy*: *Fusarium oxysporum*; CH 1: 2',3',4' Trimetoxi- 1,3- difenil- 2 propen- 1 ona; ch 2: 1,3- difenil- 2 propen- 1ona; vainillina: 3 metoxi- 4 hidroxil- benzaldehído; isovainillina: 4 metoxi- 3 hidroxil- benzaldehído.

## DISCUSIÓN

El estudio de compuestos antifúngicos naturales que inhiban o eviten el desarrollo de enfermedades fúngicas de importancia agronómica, es una opción sustentable para reducir la presión que los productores tienen actualmente para el control sanitario de distintas producciones agrícolas extensivas, intensivas y/o periurbanas, tal lo expresa Yanar et al. (2011). Además ciertos patógenos no sólo generan problemas económicos y productivos, sino que ponen en riesgo la salud de las personas debido a ciertas toxinas liberadas, conocidas como micotoxinas (Desjardns, 2006; Peruzzo y Pioli, 2017). Por lo tanto, sería oportuno y relevante la consideración de los resultados obtenidos no sólo para evitar la disminución de rendimientos agronómicos sino además para preservar la salud humana.

Entre los compuestos naturales de origen vegetal evaluados, las isoflavonas daidzeína y genisteína no han presentado acción antifúngica *in vitro* frente a los patógenos estudiados en ninguna de las concentraciones evaluadas. Estos resultados fueron similares a los obtenidos *in vivo* (*G. max*) e *in vitro* por Pioli et al. (2004) sobre dos especies de *Phomopsis*, tales como *P. longicolla* y *P. phaseoli* var. *meridionalis* y var. *caulivora*. Mientras que estas isoflavonas resultaron efectivas *in vivo* frente a patógenos de infección radicular como algunas cepas de *Fusarium* causales de la muerte repentina o súbita en soja de EE.UU (Lozovaya, 1999). Asimismo Lozovaya et al. (2004) demostraron el rápido aumento de isoflavonas en raíz de papa cuando las mismas eran infectadas con *F. solani* lo cual brindaría resistencia parcial frente a la enfermedad. No obstante, de acuerdo a Pioli et al. (2004) la concentración y efectividad de estos isoflavonoides frente a la infección dependerá no sólo del patógeno al cual se enfrenta, sino además del tiempo transcurrido a partir de la penetración, y la distribución diferencial de estos compuestos a través de los distintos tejidos de la planta infectada. Por lo tanto al igual que Graham (1991), se deberían estudiar los perfiles de distribución y variaciones en la concentración de potenciales compuestos antifúngicos en las propias plantas a fin de evaluar su utilidad y eficacia para inhibir diferentes enfermedades vegetales, más allá de la respuesta positiva o neutra que los compuestos tengan en los ensayos *in vitro*.

Acorde a Carpinella et al. (2003), la búsqueda, detección y desarrollo de compuestos antimicóticos a partir de plantas es una oportunidad para que los mismos sean utilizados como bio-plaguicidas en el futuro. Coincidiendo con el autor, la vainillina ha tenido un comportamiento efectivo frente a todos los patógenos con los cuales ha sido puesto en contacto. Los resultados demostraron que la vainillina es capaz de inhibir el crecimiento de colonias fúngicas pero resulta más relevante aun su accionar fungicida debido a que evitó o eliminó la posibilidad de crecimiento de los micelios evaluados. El rol y efecto de éste y otros compuestos semejantes son importantes de analizar debido a la eficacia potencial sobre el control sustentable de enfermedades en las producciones agrícolas y hortícolas.

Por lo tanto, la aplicación a campo de la vainillina permitiría lograr una demora o retraso en la etapa de contacto- penetración- infección (aparición de síntomas), en la colonización e invasión de tejidos durante el proceso de patogénesis de la enfermedad, como además disminuir el reservorio de inóculo durante la etapa de supervivencia del patógeno asociada a los restos vegetales, debido al efecto fungicida que ejerce sobre las unidades formadora de colonias. Además tal lo plantea Carpinella et al. (2003), su presencia en los alimentos como saborizante indicaría su baja toxicidad para los mamíferos, lo cual le brinda mayores beneficios al uso de dicho compuesto en la producción agrícola y subproductos derivados alimenticios.

Al evaluar la acción del compuesto sintético de similar estructura química, la iso-vainillina, se determinó la importancia del compuesto natural sobre aquellos isómeros sintéticos, ya que este último no presentó la misma forma de acción frente a los patógenos.

Al parecer el origen de las moléculas utilizadas tiene gran influencia a la hora de su acción frente a los distintos patógenos. El compuesto conocido como vainillina se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza siendo parte de distintas familias botánicas (Opdyke, 1977; Flores y Quintanar, 1982), entre ellas la familia *Meliaceae*. Su utilización o aplicación como posible compuesto antifúngico permite suponer diferentes formas de producción a gran escala; entre ellas, considerando la distribución extendida de la especie arbórea, el compuesto podría obtenerse a partir de una cosecha racional de los frutos de *Melia azedarach*, los cuales son los

principales reservorios de dicho compuesto (Carpinella et al., 2003). Una alternativa a la producción y obtención natural de la vainillina, podría ser la obtención de manera artificial o sintética de este compuesto antifúngico, para evitar tanto el riesgo de una extracción desmedida de frutos y/o semillas y depredación de individuos arbóreos como la posibilidad de generar una disminución de la diversidad genética vegetal por instalación de grandes áreas con plantaciones arbóreas homogéneas o pocas especies.

Otros compuestos encontrados en la naturaleza pero también de síntesis en el laboratorio, son las chalconas. Los resultados indicaron que sólo la chalcona 2 inhibió el crecimiento de las colonias de cuatro cepas fúngicas y presentó efecto fungicida sólo sobre dos de ellas, mientras que no hubo ningún tipo de respuesta para la chalcona 1. Al comparar dichos resultados con los de Svetaz et al. (2004), se pudo observar que las chalconas, como grupo químico, tienen distintas respuestas frente a diferentes patógenos o cepas de un mismo patógeno. Esto quedó demostrado al analizar los resultados obtenidos en este trabajo, donde si bien algunos efectos pueden ser similares, los valores de CIM y CFM no son equivalentes a los presentados por Svetaz et al. (2004), incluso al analizar el comportamiento frente a las dos cepas de *F. graminearum* que fueron evaluadas en ambos trabajos. Tal vez la efectividad de estas moléculas se deba al origen y/o composición química de dichos compuestos. Aquellos planteados por Svetaz et al. (2004) son extraídos de la parte aérea de *Zuccagnia punctata* (*Fabaceae*, *Caesalpinoideae*, *Caesalpinieae*) mientras que las chalconas evaluadas en este trabajo son de origen sintético, esto tal vez defina que su accionar aun frente al mismo patógeno sea diferente.

Los compuestos antifúngicos de origen natural y/o sintéticos, rápidamente degradados en el suelo son potencialmente inocuos para los seres humanos y animales si su aplicación se ajusta a las concentraciones y frecuencias avaladas por resultados experimentales y la normativa vigente (Rodríguez Maturino, 2015).

Este trabajo constituye la primera etapa de una línea de investigación que prevé futuras acciones orientadas a determinar: a) la forma de síntesis y expresión de estos metabolitos en las plantas, b) su forma de acción frente a diferentes patógenos, c) el efecto de los bio-compuestos sobre tejido vegetal *in vivo* y a campo

con el fin de evaluar su funcionalidad y efectividad, y d) su inocuidad sobre salud animal y el ambiente. De acuerdo a los resultados, la vainillina y la chalcona 2 constituyen moléculas biológicas de efecto anti-fúngico que ameritan seguir siendo evaluadas en las siguientes etapas.

Respecto a los fungicidas comerciales, incluidos como controles experimentales, se pudo observar que los principios activos tienen un accionar diferencial frente a los patógenos bajo estudio, pudiendo ser efectivos para inhibir y/o evitar el crecimiento de algunas cepas fúngicas con valores mínimos de CIM y CFM ( $< 5 \mu\text{g/ml}$ ) o bien no controlando a otras. Estos resultados se contraponen a las “Indicaciones de Uso” sugeridas por la industria productora en los respectivos marbetes de estos compuestos comerciales. Tales divergencias podrían deberse a que las concentraciones utilizadas experimentalmente durante este estudio se ajustaron a la normativa vigente (CLSI) y se desconoce si coinciden o son similares a las dosis utilizadas en las aplicaciones de los productos en condiciones de campo.

Carbendazim 50 demostró ser efectivo en diferentes concentraciones para las especies fúngicas *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *P. longicolla*, *F. subglutinans* y *F. oxysporum*. Sin embargo, el mismo no ha tenido acción inhibitoria ni fungicida frente a *R. stolonifer* (CIM y CFM  $> 250 \mu\text{g/ml}$ ), coincidiendo este resultado a lo expresado por Cavallo et al. (2005). Asimismo, dicho principio activo no ha podido inhibir las cepas de *F. proliferatum* y *F. graminearum* (CIM y CFM  $> 250 \mu\text{g/ml}$ ) diferenciándose en este último caso de los resultados obtenidos por Svetaz et al. (2004).

De la misma manera, el Azoxy Pro ha tenido diferentes respuestas en base a que patógenos son evaluados. Fue en el género *Fusarium* donde la acción antifúngica sobre las distintas especies del género fue más evidente, y también al comparar los resultados obtenidos en este trabajo y los publicados por otros autores. Esto sucede con *F. oxysporum* que no fue controlado por el compuesto activo de azoxistrobina, resultados que coinciden con lo planteado por Araya González (2013) pero diferente a lo propuesto por la industria productora del producto. Es interesante señalar que este compuesto es efectivo para inhibir *R. stolonifer* y a *Fusarium subglutinans*. Asimismo al comparar el efecto ejercido sobre las dos cepas de *F. graminearum* evaluadas se obtuvieron respuestas disímiles a otros autores, ya que

las concentraciones inhibitorias y/o fungicidas fueron mayores a las expresadas en el trabajo presentado por Svetaz et al. (2004).

Como ha quedado demostrado, la efectividad de ciertos compuestos vegetales como ser la vainillina y la chalcona 2 fueron semejantes y/o hasta superiores a la presentada por los compuestos comerciales. Considerando el riesgo de contaminación química por el uso sostenido y posiblemente inadecuado de los fungicidas comerciales y el riesgo de contaminación biológica (micotoxinas) en alimentos para animales y humanos generado por el no control y predominio desbalanceado de poblaciones fúngicas con capacidad toxicogénica, justifican y ameritan continuar con el estudio de estas propuestas de control alternativas basadas en compuestos de origen vegetal.

## CONCLUSIONES

Las plantas han desarrollado respuestas fisiológicas tanto para mantener su equilibrio metabólico como para protegerse de los patógenos y distintas formas de estrés de origen biótico y abiótico. Como parte de estas respuestas surgen los metabolitos secundarios inducidos a partir de las etapas de penetración y pre-colonización patógena a fin de reconocer y evitar la instalación de hifas fúngicas en sus tejidos.

La importancia de este estudio reside en haber logrado identificar estos compuestos factibles de ser utilizados con fines agronómicos, los cuales son naturales, biodegradables y que en las dosis adecuadas evaluadas en bio-ensayos futuros no afectarían la salud animal, la salud humana y el ambiente.

En base a los resultados obtenidos, los compuestos tanto naturales como sintéticos presentaron respuestas diferentes frente a los patógenos bajo estudio.

Las isoflavonas no han sido efectivas en su acción inhibitoria y/o fungicida para los patógenos en el contexto experimental de este trabajo, más allá, de la relevancia fisiológica que poseen dentro del metabolismo vegetal. Por lo tanto se debería seguir evaluando el accionar de los mismos dentro de las diferentes especies vegetales de interés agronómico.

La vainillina ha sido capaz de controlar y hasta inhibir el crecimiento de las nueve cepas incluidas en ocho especies y cinco géneros fúngicos bajo estudio, esto demuestra que su espectro de acción es amplio. Es de interés para este trabajo remarcar el hecho de que este compuesto actuó como fungicida de las nueve cepas estudiadas lo que hace relevante continuar su estudio como potencial bio-fungicida.

La chalcona 2 ha sido efectiva frente a cuatro especies fúngicas demostrando así que aun siendo un compuesto con menor espectro de acción puede ser otra opción capaz de controlar ciertos patógenos fúngicos de importancia agronómica.

Estos dos compuestos químicos evaluados in-vitro: la vainillina y chalcona 2, presentaron capacidad anti fúngica en diferente grado y especificidad sobre los aislamientos, siendo el primero un anti fúngico más generalista o de mayor espectro que los compuestos comerciales utilizados como controles.

El reconocimiento de estos compuestos químicos permitirá producirlos a gran escala tanto para obtener un producto comercial como para continuar el estudio de los mecanismos fisio-genéticos que regulan su producción dentro de la planta. La obtención de dichos compuestos debería basarse en un método racional y ecológico y orientarse al manejo integrado de enfermedades.

Siendo los compuestos antifúngicos productos naturales, rápidamente degradados en el suelo y potencialmente inocuos para los seres humanos y animales si su aplicación se adecua a las concentraciones y frecuencias avaladas experimentalmente y la normativa regulatoria vigente, la adopción de estos metabolitos como potenciales bio-fungicidas permitiría aportar beneficios a las propias plantas, a la población humana y al ambiente.

## BIBLIOGRAFÍA

Agrios GN. 2005. Plant Pathology. 5° Edición. Editorial Academic Press. P.952.

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory Mycology. 4° Edition. Editorial J W & Sons, Inc. P. 833.

Araya González P, Sandoval Briones C, Núñez Abarca F. 2013. Eficiencia de Distintos Fungicidas sobre el Control *in vitro* de *Fusarium oxysporum* aislado de Frutos de Kiwi. Editorial de la Universidad de Talca. Chile.

Badaracco P, Sortino M, Pioli R. 2018. Estudio de Compuestos Vegetales con potencial acción fungicida sobre patógenos de plantas de interés regional. XXVI Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM. Mendoza, Argentina.

Barnett H y Hunter B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 3° Edición. APS Press. P. 218. St. Paul, Minnesota, USA.

Carpinella M, Giorda L, Ferrayoli C, Palacios S. 2003. Antifungal Effects of Different Organic Extracts from *Melia azedarach* L. on Phytopathogenic Fungi and Their Isolate Active Components. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 2506-2511.

Cavallo A, Novo R, Perez M. 2005. Eficiencia de Fungicidas en el Control de la Flora Fúngica Transportada por Semillas de Mani (*Arachis hypogaea*) en la Argentina. Agriscientia22: 9-16.

CLSI. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved. Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

Curtis Helena. 2008. Biología. Panamericana. 1160 p. 7a. ed.

Desjardins A. 2006. *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. The American Phytopathological Society.

Flores M A, Quintanar J L. 1982. Obtención de Vainillina a partir de Aceite Esencial de Clavo de Olor (Tesis de Grado). Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México.

Frioni L. 2011. Primera Edición. Buenos Aires. Orientación Gráfica Editora. 744 p.

García D E. Los Metabolitos Secundarios de las Especies Vegetales. Pastos y Forrajes 27. ISSN 2078-8452. Disponible en: <<https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path%5B%5D=795>>. Fecha de acceso: 03 Mayo 2018

García-Mateos R, Pérez-Leal R. 2003. Fitoalexinas: Mecanismo de defensa de las plantas. RevistaChapingo 9: 5-10.

Graham Terrence L. 1991. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. Revista Plant Physiol. 95:594-603.

Grayer R, Harborne J. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants. JournalPhytochemistry, vol 37: 19-42.

Hernández F, Pioli R, Peruzzo A, Formento A, Pratta G. 2015. Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *Phomopsis longicolla* (teleomorfo desconocido: Diaporthales) de la región templada y subtropical de Argentina. Revista de Biología Tropical, 63: 871-884.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2008. Aplicación eficiente de fitosanitarios. Ediciones INTA. Cap: 2

Leslie J y Summerell B. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing.

Lygin A V, Hill C B, Pawlowski M, Zernova O V, Widholm J M, Hartman G L y Lozovaya V V. 2014. Inhibitory effects of stilbenes on the growth of three soybean pathogens in culture. Phytopathology 104:843-850.

Lozovaya, V.V.; Lygin, A.V.; Li, S.; Hartman, G.L. and Widholm, J.M. 1999. Alteration of phenylpropanoid metabolism in soybean plants inoculated

with *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, the sudden death syndrome pathogen. Page 610 in: Proc. VI World Soybean Research Conference. Chicago. USA.

Lozovaya V, Anatoliy L, Zernova O, Shuxian L, Hartman G, Widholm J. 2004. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 671–679.

Maestro-Durán R, León R, Ruiz-Gutiérrez V. 1993. Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. *Revista de Consejo Superior de Investigaciones Científicas Licencia: Grasas y Aceites*, Vol. 44: 365-369.

Muller K. Borger H. 1940. Experimentelle Untersuchungen über die Phythophthora-Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst. Land Forstwirtschaft*. 23:1 89-231

Opdyke D L J. 1977. *Food and Cosmetic Toxicology. Fragrance Raw Material Monograph*, Vol 15: 633-638.

Peruzzo MA y Pioli RN. 2017. Effect of the toxicogenic ability of *Fusarium graminearum* on physiological quality of soybean seeds and flours. In *Soybean: cultivation, nutritional properties and effects on health*. Nova Sc. Publishers. Pág: 119-152.

Pioli R, Benavídez R, Morandi E. 1997. "Estudio preliminar sobre la Incidencia de Patógenos en Semillas de Soja (*Glycine max*) para consumo humano fresco - eda mamá". Ed. Asoc. Latinoamer. *Fitopatol*, Vol. 32:116-120.

Pioli R, Benavídez R, Morandi E, Bodrero M. 2000. "Estudio epidemiológico de patógenos fúngicos asociados a semillas y frutos de soja". Ed. Asoc. Latinoam, 35:111-118.

Pioli R N, Morandi E N, Martínez M C, Lucca M F, Tozzini A, Bisaro V, Hopp HE. 2003. Morphological, Molecular and Pathogenic Characterization of *Diaporthe phaseolorum* Variability in the Core Soybean Producing Area of Argentina. Ed. The Am. Phytop. Soc, 93:136-146.

Pioli R, Hernández R, Dietrich M L, Catalán C, Morandi E. 2004. Isoflavonoids role in defense mechanisms associated with *Glycine max* – *Diaporthe*

*phaseolorum* var. *meridionalis* interaction. VII<sup>o</sup> World Soybean Forum: Congreso Mundial de Soja. III<sup>o</sup> Congreso Brasileiro de Soja. PO31, Pág. 73.

Pioli, R. "Importancia de la Patología de Semillas". Análisis de semillas 1(1):60-65.

Rodríguez-Maturino A, Troncoso-Rojas R, Sánchez-Estrada A, González-Mendoza D, Ruiz-Sanchez E, Zamora-Bustillos R, Cecena-Duran C, Grimaldo-Juarez O, Aviles-Marin M. 2015. Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chilpetin (*Caspicum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Revista Argentina de Microbiología 47: 72-77.

Sortino M, Derita M, Zacchino S. 2011. Diferentes estrategias para la búsqueda de compuestos antifúngicos. Editorial Académica Española, p 231.

Svetaz L, Tapia A, Lopez S, Furlan R, Petenatti E, Pioli R, Schemeda-Hirschmann G, Zacchino S. 2004. Antifungal Chalcones and New Caffeic Acid Esters from *Zuccagnia punctata* acting against Soybean Infecting Fungi. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 3297-3300.

Taiz L y Zeiger E. 2002. Plant physiology. 3rd edn. 690 pp

Udayanga D, Liu XX, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD. (2011). Fungal Divers, 50: 189-225.

Yanar Y, Kadioğlu I, Gökçe A, Demirtaş I, Gören N, Çam H, Whalon M. 2011. In vitro antifungal activities of 26 plant extracts on mycelial growth of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. African Journal of Biotechnology Vol. 10: 2625-2629.

Zacchino S y Gupta M. 2007. Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos. 1<sup>o</sup> Edición- Rosario. Corpus Editorial y Distribuidora. Capítulo 9: 85-97.