



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN AGRONOMÍA

**ESTUDIO DEL EXTRACTO DE PROPÓLEOS Y
DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO
PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS
DE IMPORTANCIA EN LA PRODUCCIÓN HORTÍCOLA**

Ing. Agr. Irene Laura Cibanal

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2023

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur durante el período comprendido entre marzo 2017 y mayo de 2023, bajo la dirección de la Dra. Cecilia N. Pellegrini y la codirección de la Dra. Leticia A. Fernández.

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../.....,
mereciendo la calificación de(.....)

“Mira profundamente en la naturaleza y entonces comprenderás
todo mejor”

ALBERT EINSTEIN

*Dedicada con gran cariño a mis padres,
Laura y Jesús,
a mis abuelas y abuelos
y a la memoria de Mechi...*

AGRADECIMIENTOS

- A las Doctoras Cecilia N. Pellegrini y Leticia A. Fernández, directoras de esta tesis, por haberme transmitido conocimientos valiosos, por colaborar a lo largo de todo el trabajo y por la corrección de este manuscrito.
- Nuevamente a la Dra. Leticia A. Fernández, por haberme guiado con calidez y empatía, por confiar en mí y por su estímulo constante para seguir adelante.
- A la Mg. Ing. Agr. Liliana M. Gallez, directora del Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA) del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS), lugar en el que realicé la tesis, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por brindarme generosamente sus consejos.
- Al equipo del LabEA, por su apoyo incondicional. Agradezco en particular a Sole, Lucho, Gise, Juan, Agus y Mati por los buenos momentos compartidos en las jornadas de trabajo.
- Al Dr. Antonio Garayalde, por el asesoramiento en el análisis estadístico de datos.
- Al equipo de la Dra. Ana P. Murray, principalmente a la Dra. Silvana Rodríguez, del Depto. de Química de la UNS, por colaborar con las determinaciones químicas de los productos naturales.
- Al área de suelos del Departamento de Agronomía de la UNS, por poner a disposición materiales y equipamiento para la caracterización de los productos naturales.
- A la Familia Hofmeister, productores agropecuarios que atendieron amablemente mis visitas técnicas y donaron “ajo-semilla” para los ensayos.
- A todos los profesionales y estudiantes de distintos ámbitos que colaboraron con materiales y equipamiento de trabajo, aportaron conocimiento técnico y/o participaron en los ensayos. Ellos son: Dra. Gabriela Krepper, Dra. Marina Díaz, Dra. Betina Agaras, Dra. Ivana Fernández Moroni, Dra. Mónica Baldini, Dr. Francisco Reynaldi, Dra. Soledad García Paoloni, Ing. Agr. Aldo López, Ing. Agr. Mirta Khier, Ing. Agr. Antonela Gil, Ing. Agr. Gabriel Malizia, Ing. Agr. Leticia Karina Fernández, Técnica Johanna Buedo, Técnico Martín Sarti y estudiante de grado Milca Cruz.
- A la Dra. Elisa Silvera-Pérez, su equipo y colegas de la Universidad de la República (Uruguay), por darme la posibilidad de trabajar en conjunto.
- A la Subsecretaría de Internacionalización de la UNS, por facilitarme la posibilidad de realizar estadías académicas en el exterior.
- A mis compañeras de docencia de la cátedra de Fisiología Vegetal de la UNS, por apoyar mi formación doctoral.
- A los jurados de esta tesis, por la corrección de este manuscrito.

- Al Departamento de Agronomía de la UNS, por ser mi lugar de trabajo durante el doctorado.
- A la Universidad Nacional del Sur, por brindarme la posibilidad de realizar el doctorado.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), por otorgarme becas de posgrado.
- A la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM), por becarme para realizar una estadía de investigación en Uruguay.
- A mis amigos, familiares y colegas, por su aliento y compañía en estos años.
- A mi novio, Mati, por su ayuda y apoyo para alcanzar la meta de doctorarme.
- Por último, y no menos importante, a mi familia. A mis hermanas, Ro y Chechu, por su colaboración. A Pupi, mi perrita, por su amor y compañía, especialmente durante la escritura de la tesis. A mis papás, Laura y Jesús, por el gran sacrificio que hicieron para brindarme educación y por ayudarme incansablemente.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
SIGLAS Y ABREVIATURAS	5
CAPÍTULO 1 – Introducción general.....	7
1-1. Contexto actual	7
1-2. Productos naturales bioactivos aplicados a la sanidad vegetal	8
1-3. Metabolitos secundarios vegetales y biopesticidas botánicos	9
1-3.1. Propóleos	11
1-3.2. Aceite esencial de orégano.....	12
1-4. Fitopatógenos y enfermedades de los cultivos hortícolas.....	13
1-4.1. <i>Penicillium allii</i> causante de la mufa del ajo	15
1-4.2. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> causante de la podredumbre blanca en poroto	15
1-4.3. Bacterias fitopatógenas	15
1-5. Hipótesis y objetivos.....	16
1-6. Esquema de trabajo	17
CAPÍTULO 2 - Caracterización de productos naturales bioactivos: propóleos y aceite esencial de orégano	19
2-1. Introducción	19
2-2. Materiales y métodos	22
2-2.1. Caracterización de muestras de propóleos en bruto y sus extractos.....	22
2-2.1.1. Origen y caracterización sensorial, física y química de propóleos en bruto.....	22
2-2.1.2. Elaboración y caracterización de extractos de propóleos	26
2-2.1.3. Análisis estadístico de datos	29
2-2.2. Caracterización de aceites esenciales de orégano	30
2-2.2.1. Origen de las muestras de orégano y obtención de aceites esenciales	30
2-2.2.2. Caracterización química de los aceites esenciales.....	30
2-3. Resultados y discusión.....	32
2-3.1. Caracterización de muestras de propóleos en bruto y sus extractos.....	32

2-3.2. Caracterización de aceites esenciales de orégano	40
2-3.3. Caracterización de los PNB: consideraciones finales	46
2-4. Conclusiones	46
CAPÍTULO 3 – Caracterización de fitopatógenos de especies hortícolas	48
3-1. Introducción	48
3-2. Materiales y métodos	49
3-2.1. <i>Penicillium allii</i> fitopatógeno de ajo	49
3-2.2. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> fitopatógeno de poroto pallares	51
3-2.3. Bacterias fitopatógenas del cultivo de tomate	52
3-3. Resultados y discusión.....	53
3-3.1. <i>Penicillium allii</i> fitopatógeno de ajo	53
3-3.2. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> fitopatógeno de poroto pallares	55
3-3.3. Bacterias fitopatógenas del cultivo de tomate	58
3-4. Conclusiones	59
CAPÍTULO 4 – Estudios <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre fitopatógenos	60
4-1. Introducción	60
4-2. Materiales y métodos	61
4-2.1. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre <i>Penicillium allii</i>	61
4-2.1.1. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana individuales	61
4-2.1.2. Prueba de sinergismo antifúngico	64
4-2.1.3. Análisis estadístico de los datos.....	65
4-2.2. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	65
4-2.2.1. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana individuales	65
4-2.2.2. Prueba de sinergismo antifúngico	66
4-2.2.3. Análisis estadístico de los datos.....	66
4-2.3. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> del extracto de propóleos sobre bacterias fitopatógenas del tomate.....	67

4-2.3.1. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	67
4-2.3.2. Diseño y análisis estadístico de los datos	67
4-3. Resultados y discusión.....	67
4-3.1. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre <i>Penicillium allii</i>	67
4-3.2. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	74
4-3.3. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> del extracto de propóleos sobre bacterias fitopatógenas del tomate.....	78
4-3.4. Propiedades antimicrobianas del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano: análisis integrador de los resultados <i>in vitro</i>	81
4-4. Conclusiones	82
CAPÍTULO 5 – Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre propágulos hortícolas.....	84
5-1. Introducción	84
5-2. Materiales y métodos	85
5-2.1. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la germinación de lechuga	85
5-2.2. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la brotación de ajo.....	88
5-2.3. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la germinación de poroto pallares	91
5-3. Resultados y discusión.....	92
5-3.1. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la germinación de lechuga	92
5-3.2. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la brotación de ajo.....	98
5-3.3. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la germinación de poroto pallares	100
5-3.4. Propiedad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano: un aspecto clave a evaluar en aplicaciones fitosanitarias	102
5-4. Conclusiones	103

CAPÍTULO 6 – Actividad antimicrobiana <i>in vivo</i> del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre fitopatógenos de propágulos hortícolas	104
6-1. Introducción	104
6-2. Materiales y métodos	105
6-2.1. Actividad antifúngica <i>in vivo</i> del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano frente a la mufa del ajo	105
6-2.2. Actividad antifúngica <i>in vivo</i> del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano frente al moho blanco en semillas de poroto pallares.....	108
6-3. Resultados y discusión.....	109
6-3.1. Actividad antifúngica <i>in vivo</i> del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano frente a la mufa del ajo	109
6-3.2. Actividad antifúngica <i>in vivo</i> del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano frente al moho blanco en semillas de poroto pallares.....	112
6-3.3. Perspectivas sobre la aplicación del extracto de propóleos y el aceite esencial de orégano para la protección de propágulos frente a fitopatógenos ...	115
6-4. Conclusiones	116
CAPÍTULO 7 – Consideraciones finales	118
BIBLIOGRAFÍA.....	122
ANEXO - Publicaciones científicas	150

RESUMEN

Existe un gran interés por estudiar productos naturales bioactivos que ofrezcan una alternativa sustentable para el control de las enfermedades en cultivos. El propóleo y los aceites esenciales se presentan como candidatos promisorios en tal sentido, ya que poseen compuestos derivados del metabolismo secundario vegetal con actividad biológica. No obstante, las investigaciones al respecto son escasas. En este contexto, el objetivo de esta tesis fue estudiar de forma integral las características de extractos de propóleos y de aceites esenciales de orégano, su actividad antimicrobiana individual y combinada frente a diversos fitopatógenos y su acción fitoinhibitoria sobre propágulos de especies cultivadas.

Para esto, el esquema de trabajo comenzó con la bioprospección de distintos extractos de propóleos (EP), así como de aceites esenciales de orégano (AEO). Las muestras presentaron diversas características, destacándose que todas contenían una abundante cantidad de compuestos bioactivos pertenecientes al grupo de los fenoles en los EP, y de los terpenos en los AEO. Luego, se probaron *in vitro* las propiedades antimicrobianas del EP y del AEO frente a fitopatógenos aislados de propágulos hortícolas y caracterizados morfológica y genotípicamente. Ambos productos mostraron diferencias en su eficacia y forma de actuar frente a *Penicillium allii* y a *Sclerotinia sclerotiorum*. El hallazgo más novedoso de estos estudios fue que la combinación de EP con AEO tuvo un efecto antifúngico sinérgico frente a los mencionados patógenos. Por otro lado, también se probó la acción antibacteriana del EP sobre bacterias fitopatógenas. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas gardneri*, *X. vesicatoria* y *Pseudomonas corrugata* resultaron sensibles a dicho producto.

En los estudios referidos a las propiedades fitoinhibitorias del EP y del AEO sobre propágulos de lechuga (*Lactuca sativa*), ajo (*Allium sativum*) y poroto pallares (*Phaseolous lunatus*), se evidenció que existen diferencias en su tolerancia a la aplicación de los productos estudiados. Estos ensayos permitieron seleccionar formulaciones a base de EP y/o de AEO sin efectos adversos para dichos diseminulos, lo que fue fundamental para evitar comprometer su calidad fisiológica. Por último, a través de estudios *in vivo*, se determinó que la combinación de EP con AEO disminuyó la incidencia y la severidad de la mufa del ajo causada por *P. allii* en bulbillos, y de moho blanco causado por *S. sclerotiorum* en semillas de poroto pallares. Estos resultados constituyeron el primer reporte respecto de la actividad antifúngica *in vivo* del EP combinado con AEO frente a las mencionadas enfermedades.

El trabajo realizado en esta tesis, además de ser de gran interés respecto de las características y propiedades del EP y del AEO, reporta por primera vez la acción antifúngica sinérgica que se logra al combinarlos. Los resultados obtenidos demostraron el gran potencial que poseen ambos productos para el control de enfermedades en las semillas, lo que permitirá avanzar en el desarrollo de alternativas sustentables para el manejo de fitopatógenos en la horticultura.

Palabras claves: antifúngico, bioactividad, biofungicida, fitopatógenos, horticultura, semillas

ABSTRACT

In recent years, there has been a growing interest in the use of biofungicides as safe and effective alternatives for crop protection. Propolis and essential oils are potential candidates, due to their biological activity related to the secondary metabolites they contain. However, research in this area is scarce. The aim of this thesis was to comprehensively study the characteristics of propolis extracts and oregano essential oils, their individual and combined antimicrobial activity against several phytopathogens, and their phytoinhibitory action on plant crop propagules.

Accordingly, a work scheme was followed. It began with the bioprospection of different samples of propolis extracts (PE), as well as of different oregano essential oils (OEO). The samples showed different characteristics, all containing a large number of bioactive compounds from the group of phenols in PE and terpenes in OEO. The antimicrobial properties of PE and OEO were then tested *in vitro* against phytopathogens isolated from horticultural seeds previously characterized morphologically and genotypically. Both products showed differences in their efficacy and mode of action against *Penicillium allii* and *Sclerotinia sclerotiorum*. The most significant finding was that the combination of PE with OEO had a synergistic antifungal effect against the fungi mentioned. On the other hand, the antibacterial activity of PE against several phytopathogenic bacteria was also demonstrated. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas gardneri*, *X. vesicatoria*, and *Pseudomonas corrugata* showed sensitivity to this product.

Studies on the phytoinhibitory properties of PE and OEO over lettuce (*Lactuca sativa*), garlic (*Allium sativum*), and lima bean (*Phaseolous lunatus*) propagules showed that there are differences in the tolerance of these structures to the tested products. These assays allowed selecting formulations based on PE and/or OEO without evidencing adverse effects on the seeds, which was crucial to avoid compromising their physiological quality. Finally, through *in vivo* studies, it was determined that the combination of PE with OEO reduced the incidence and severity of blue mold caused by *P. allii* in garlic bulbs and of white mold caused by *S. sclerotiorum* in lima bean seeds. These results led to the first report of *in vivo* antifungal activity of PE combined with OEO against those diseases.

This work provides valuable information on the characteristics and properties of PE and OEO. It also proves the synergistic antifungal action exerted when combining them. The results reported show the significant potential of both products to control seed disease. These findings will allow developing sustainable alternatives for the management of phytopathogens in horticulture.

Keywords: antifungal, bioactivity, biofungicide, phytopathogens, horticulture, seeds

SIGLAS Y ABREVIATURAS

- AA: Agar agua
- ACP: Análisis multivariado de componentes principales
- ADE: agua destilada estéril
- AEO: aceite esencial de orégano
- ANAVA: Análisis de la varianza
- AND: Agar nutritivo dextrosa
- APD: Agar papa dextrosa
- AST: Antimicrobial Susceptibility Testing o antibiogramas
- C %: Contenido de cenizas
- CFM: Concentración fungicida mínima
- CIF: Concentración inhibidora fraccional
- CIM: Concentración inhibitoria mínima
- Cmm*: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
- CN: Caldo nutritivo
- CP: Componentes principales
- CYA: medio de cultivo Czapeck (Czapeck yeast extract agar)
- DAD: Arreglo de detector de diodos
- E %: Porcentaje de ceras
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- EP: Extracto de propóleos
- ES %: Extracto seco
- GC-MS: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
- H %: Pérdidas por calentamiento
- HA: Hidroalcohol
- HyL: Hongos y levaduras
- I %: Porcentaje de inhibición
- ICIF: Índice de la concentración inhibitoria fraccional
- IK: Índices de retención o Índice Kovats
- ITS: Espacios (regiones) de intergenes ribosomales transcriptos (Internal Transcribed Spacer)
- IVD: Índice visual de dormición
- LSD: Diferencia mínima significativa (Least significant difference)
- P: Propóleos
- P1000: Peso de mil semillas
- PNB: Producto/s natural/es bioactivo/s

PS: Peso seco

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Laurilsulfato sódico

TLC: Bioautografía por cromatografía en capa (Thin Layer Chromatography)

Tris: Trisaminometano

TW o TW20: Tween 20

u.f.c.: Unidades formadoras de colonias

UV-VIS: Ultravioleta-visible

YDC: Extracto de levadura dextrosa

CAPÍTULO 1 – Introducción general

1-1. Contexto actual

La demanda de alimentos y de productos derivados de la agricultura se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas, debido al crecimiento poblacional sostenido a nivel mundial (Naciones Unidas, 2019; Khakimov *et al.*, 2020). Este escenario supone un desafío para el sector agrícola y la investigación científica, ya que resulta necesario aumentar la producción vegetal garantizando al mismo tiempo la rentabilidad, la seguridad alimentaria, la sostenibilidad de los recursos naturales, la salud del medio ambiente y la equidad social (Tilman *et al.*, 2011; Sanahuja y Tezanos, 2017; FAO, 2018). Dado que la superficie cultivable es un recurso finito, las estrategias planteadas para cumplir con este objetivo tienen como denominador común maximizar el rendimiento por área de cultivo (Flood, 2010).

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible impulsados por Naciones Unidas, e incluidos en el documento que lleva por título “Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible”, proponen aplicar prácticas agrícolas resilientes que reduzcan las pérdidas de rendimiento a lo largo de todo el proceso productivo (Gil, 2018). En este punto resulta clave señalar que entre el 20 y el 40 % de la producción agrícola mundial, se pierde anualmente debido a enfermedades infecciosas en los cultivos, causadas por diversos microorganismos (FAO, 2021). Las consecuencias de estas enfermedades incluyen no solo la merma en las cosechas, sino también la disminución en la calidad de los productos obtenidos, la contaminación de alimentos con toxinas y la imposición de barreras sanitarias en la comercialización (Savary *et al.*, 2012; Díaz, 2020). En relación a esto último, la Asamblea General de las Naciones Unidas proclamó al año 2020 como el “Año Internacional de la Sanidad Vegetal”, bajo el lema “Proteger las plantas, proteger la vida”, con el objetivo de visibilizar la importancia de la protección de los cultivos frente a los fitopatógenos (Khakimov *et al.*, 2020).

Actualmente, la prevención, control y erradicación de las enfermedades vegetales se realiza mayormente mediante la aplicación de productos sintéticos. De acuerdo a Sparks *et al.* (2016), las ventas de pesticidas sintéticos a nivel mundial ocuparon un 79 % del mercado, correspondiendo el porcentaje restante a bioproductos (9% bioinsecticidas, 7 % biofungicidas y 5 % bioherbicidas). Los pesticidas sintéticos, si bien han permitido un avance considerable en el manejo de los fitopatógenos desde la segunda mitad del siglo XX, especialmente a partir de la “Revolución Verde” (Sánchez Llorens, 2017), también han generado numerosas controversias (Trenc,

2001). Desde una perspectiva ecológica, los efectos de estos productos sobre el medioambiente incluyen la reducción de la biodiversidad, y la contaminación del suelo y del agua debido a su alta persistencia y baja degradabilidad, entre otros (EPA, 2010; Kumar y Singh, 2014). Asimismo, la utilización de pesticidas sintéticos de manera continua y frecuente, la aplicación de dosis por debajo o por encima de las recomendadas y la falta de empleo de otras formas de control, han llevado al desarrollo de microorganismos resistentes a los principios activos disponibles (Vallad y Goodman, 2004).

El uso de este tipo de productos también supone un riesgo para la salud humana, ya que están asociados a patologías como el cáncer, trastornos reproductivos y dermatológicos, neuropatías, deterioro inmunológico y efectos respiratorios adversos (Li y Jennings, 2018; Singh *et al.*, 2018). Cabe mencionar que estos insumos no pueden ser utilizados en producciones orgánicas (Jiménez-Reyes *et al.*, 2019). Por todos estos motivos, se ha incentivado la búsqueda, la investigación y el desarrollo de productos naturales bioactivos, que ofrezcan una alternativa sustentable para el control de fitopatógenos (Popp *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2015).

1-2. Productos naturales bioactivos aplicados a la sanidad vegetal

En un sentido amplio, los productos naturales bioactivos (PNB) comprenden organismos vivos y productos sintetizados o derivados de ellos, que tienen acción biológica sobre otros organismos. Se obtienen principalmente de plantas, microorganismos e insectos, y tienden a ser químicamente complejos (Sparks *et al.*, 2016). Desde la antigüedad han servido como herramientas en la medicina, veterinaria y agricultura. El término “biopesticidas”, ha sido utilizado para hacer referencia a los PNB que se utilizan en la protección vegetal (Gwinn, 2018). Estos han sido clasificados de acuerdo al tipo de agente bioactivo en: organismos microbianos vivos (biopesticidas microbianos), nematodos entomófagos, derivados de plantas (biopesticidas botánicos), metabolitos secundarios obtenidos de microorganismos (antibióticos), compuestos obtenidos de insectos que modifican conductas (semioquímicos) y genes incorporados a cultivos para expresar resistencia o tolerancia a plagas (“Protectores Incorporados en Planta” o “PIPs”) (Copping y Menn, 2000). A su vez, según su función, los biopesticidas se categorizan en bioinsecticidas, biofungicidas (incluye también la acción frente a bacterias fitopatógenas), bionematicidas y bioherbicidas (Abbey *et al.*, 2019).

El creciente interés en los biopesticidas está vinculado a los beneficios asociados a su uso, que a su vez los distinguen de los productos sintéticos. Se ha reportado que solo afectan a los organismos objetivos y que su toxicidad para otros

seres vivos, incluyendo a los seres humanos, es baja o nula. Los biopesticidas son efectivos en bajas dosis y se descomponen rápidamente, limitando los efectos adversos de la persistencia y consecuente contaminación de los recursos naturales. Pueden formar parte de los programas para el Manejo Integrado de Plagas y son aptos en la agricultura orgánica. Por último, constituyen una herramienta valiosa para el control de plagas resistentes, ya que en general contienen varios compuestos químicos que actúan de manera sinérgica e involucran diversos mecanismos y modos de acción (Abbey *et al.*, 2019; Alonso Gato *et al.*, 2021; El-Baki y Amara, 2021). El uso de biopesticidas brinda a los agricultores oportunidades para satisfacer las necesidades de los consumidores de manera eco-amigable, especialmente en nichos de mercado donde la seguridad alimentaria cobra mayor relevancia.

1-3. Metabolitos secundarios vegetales y biopesticidas botánicos

Los metabolitos secundarios vegetales son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que median las relaciones ecológicas de las plantas con su entorno (Hartmann, 2007). Tal como su nombre lo indica, son el resultado del metabolismo secundario, que está asociado a fases específicas del desarrollo, tanto del organismo como de sus células especializadas, y a períodos de estrés causados por factores bióticos y abióticos. Tradicionalmente han sido diferenciados de los metabolitos primarios, los cuales se producen a partir de rutas metabólicas comunes a todas las células vegetales y conducen a la formación de azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y diversos polímeros, que son esenciales para la vida celular y estrictamente necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ferne y Pichersky, 2015).

Si bien existen distintas formas de clasificar a los metabolitos secundarios vegetales, en general se los agrupa en terpenos (25.000 tipos), alcaloides (12.000 tipos) y fenoles (8.000 tipos) (Figura 1-1). Puntualmente, los terpenos o terpenoides se clasifican de acuerdo al número de átomos de carbono o de moléculas de isopreno (C_5H_8) que contienen. Existe una gran variedad de estos compuestos, incluyendo sustancias tales como el mentol, geraniol, β -caroteno, licopeno, limoneno, timol, carvacrol, además de piretroides, saponinas y resinas. Los alcaloides, por su parte, en general contienen nitrógeno derivado de aminoácidos y poseen un pH alcalino. Ejemplos de estos compuestos son la nicotina, morfina, atropina, adrenalina, efedrina y cafeína. Por último, los fenoles son compuestos de estructura aromática, con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos. El compuesto básico es el fenol (C_6H_6O). Los ácidos cumárico, caféico, gálico, ferrúlico, salicílico, así como la apigenina, quercetina y el kaempferol pertenecen a este grupo (Antolak y Kregiel, 2017).

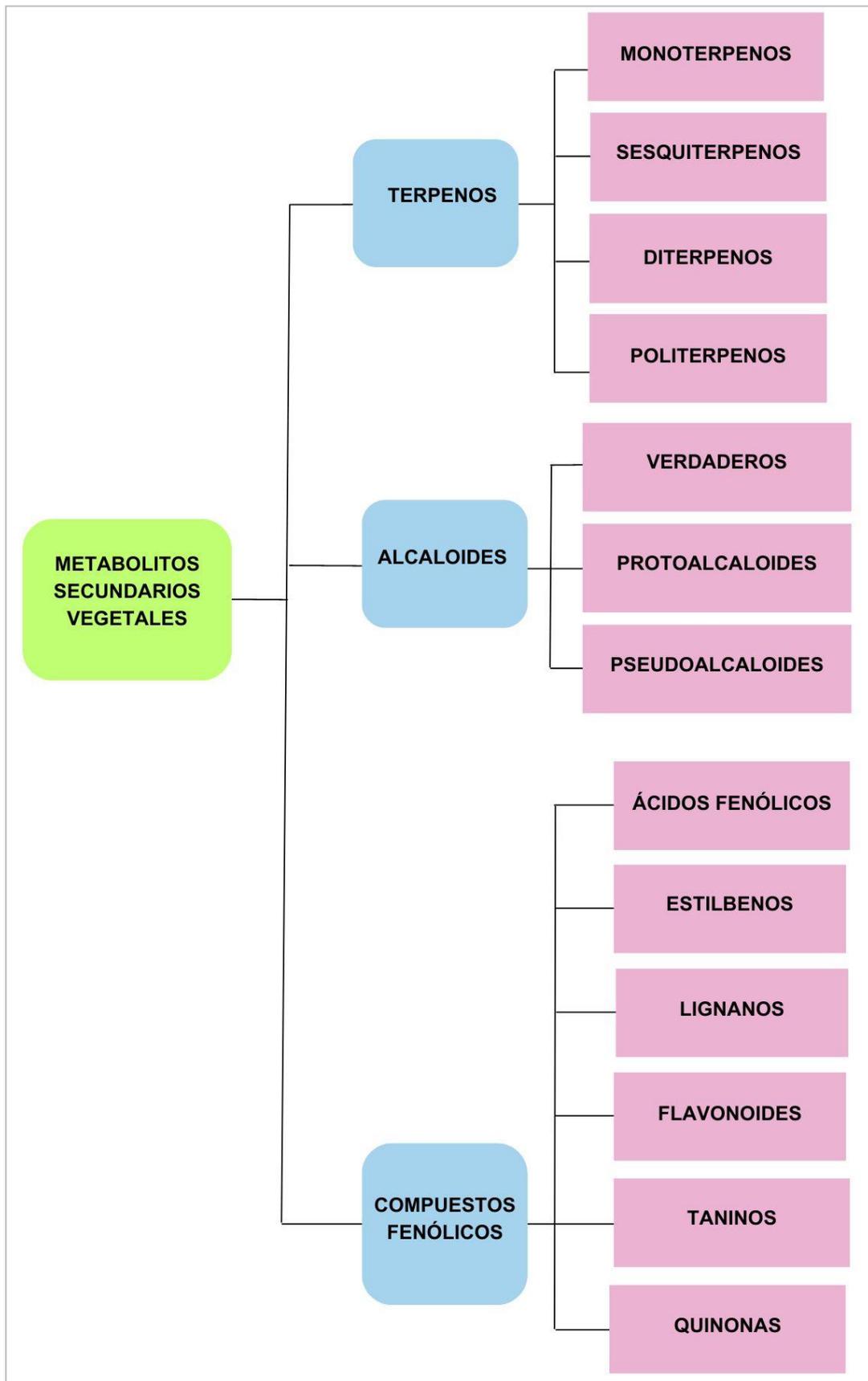


Figura 1-1. Clasificación general de los metabolitos secundarios vegetales (tomado de Antolak y Kregiel, 2017).

Respecto de las funciones de estos compuestos en las plantas, se mencionan: brindar protección frente a infecciones causadas por microorganismos, actuando como fitoquímicos con actividad antimicrobiana; intervenir en las relaciones con otros organismos vegetales, lo que se conoce como alelopatía e involucra propiedades fitoinhedoras que alteran la respiración celular, la fotosíntesis, etc.; y actuar como disuasorios nutritivos o alimentarios, que evitan la depredación por herbívoros (Azcón-Bieto y Talón, 2008). También, y en menor medida, cumplen funciones estructurales, fisiológicas y ecológicas adicionales, como brindar protección frente a los rayos UV o servir como señal para atraer animales polinizadores y dispersantes de semillas (Wink, 2008). Estudios recientes han demostrado que pueden actuar como reguladores del crecimiento y del desarrollo vegetal, reintegrándose como metabolitos primarios *sensu lato* (Erb y Kliebenstein, 2020).

Dentro de los productos naturales que contienen metabolitos secundarios vegetales y que pueden considerarse para su aplicación como biopesticidas botánicos, se encuentran el propóleo y los aceites esenciales obtenidos de especies vegetales.

1-3.1. Propóleos

Ciertas especies vegetales producen y exudan resinas, gomas y mucílagos, que contienen compuestos bioactivos derivados del metabolismo secundario vegetal. Las abejas (*Apis mellifera* L.), recolectan y combinan estas sustancias con secreciones propias, obteniendo así el propóleo, al que utilizan en la construcción, adaptación y protección de la colmena (Salamanca Grosso, 2017; Aziz *et al.*, 2021). Este producto es sólido y maleable a temperatura ambiente, y su composición química es compleja y variable, ya que depende, entre otros factores, de la vegetación de origen (Ghisalberti, 1979). Generalmente, sus principales compuestos químicos bioactivos pertenecen al grupo de los fenoles (Marcucci, 1995; Šturm y Ulrih, 2019).

En la industria, el propóleo es utilizado en productos cosméticos, farmacéuticos y de uso veterinario. Esto es principalmente debido a sus propiedades antimicrobianas (Bankova *et al.*, 2014), antioxidantes, antitumorales y antiinflamatorias (Anjum *et al.*, 2019). En el ámbito agroalimentario, las investigaciones respecto de su acción frente a fitopatógenos son escasas. Al respecto, Özcan (1999) estudió la acción de extractos acuosos de propóleo en distintas concentraciones frente a *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium digitatum*. Meneses *et al.* (2009) investigaron la acción del propóleo contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botryodiplodia theobromae*. Matny (2015) probó el efecto del propóleo iraquí sobre *Penicillium digitatum*, causante del moho gris en naranjas almacenadas. Moreno *et al.* (2020) estudiaron la acción del

propóleos argentino frente a *Penicillium digitatum* y *Botrytis cinerea*. Todos estos investigadores obtuvieron resultados alentadores respecto de la inhibición de fitopatógenos, lo que posiciona al propóleos como un potencial agente biopesticida.

1-3.2. Aceite esencial de orégano

Los aceites esenciales son mezclas lipofílicas y volátiles de metabolitos secundarios vegetales, que están principalmente asociados a la defensa de las plantas frente a predadores y fitopatógenos, y a la atracción de polinizadores (Prins *et al.*, 2010). Su nombre hace referencia a que contienen la fragancia característica de la especie vegetal de la cual provienen (Anupama *et al.*, 2019). Estos pueden obtenerse a partir de distintos órganos vegetales por destilación de arrastre de vapor, extracción con solventes volátiles, extracción con fluidos supercríticos y excepcionalmente por presión (Patra y Saxena, 2010).

Los aceites esenciales presentan una gran variabilidad en su composición química, la cual depende de la especie botánica de la cual se extraen, de la localización geográfica del cultivo, de la forma de obtención, entre otros (Hao *et al.*, 2022). La presencia de determinados compuestos bioactivos, en especial de fenoles y terpenos, les otorga a los aceites esenciales propiedades antimicrobianas, antioxidantes, alelopáticas (Fayed *et al.*, 2021), inmunomoduladoras (Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019) y antitumorales (Adorjan y Buchbuer, 2010).

El género *Origanum* incluye varias especies de plantas herbáceas, rústicas y perennes, de cuyos órganos aéreos se puede obtener un aceite esencial líquido, de color levemente amarillo y con un aroma característico. Suele estar compuesto mayoritariamente por carvacrol y timol, ambos potentes agentes antimicrobianos (Cui *et al.*, 2019). Estudios *in vitro* de la acción de este aceite esencial frente a fitopatógenos, han mostrado una alta eficacia en el control de *Fusarium graminearum* (Velluti *et al.*, 2004), *Phytophthora infestans* (Soylu *et al.*, 2006), *Sclerotinia sclerotiorum* (Soylu *et al.*, 2007) y *Plasmopara viticola* (Rienth *et al.*, 2019). Al igual que ocurre con el propóleos, la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano lo convierte en una herramienta promisoriosa para el control de fitopatógenos agrícolas.

1-4. Fitopatógenos y enfermedades de los cultivos hortícolas

Las enfermedades en las plantas implican cambios en su fisiología, morfología, integridad y/o comportamiento, y pueden conducir a la alteración parcial y/o muerte del organismo, con la consecuente disminución del rendimiento en la producción (Arauz, 1998; Rivera y Wright, 2020). Cabe mencionar que, para que una enfermedad infecciosa se desarrolle en un vegetal, deben interactuar de manera simultánea tres componentes: un fitopatógeno virulento, un hospedante susceptible y un ambiente favorable para el desarrollo de la enfermedad (Tronsmo *et al.*, 2020). Este concepto ha sido denominado “triángulo de las enfermedades” (Figura 1-2.a). Asimismo, dicho sistema interactivo se modifica cuando el hombre incorpora cultivos, con prácticas de manejo y estrategias de control de enfermedades, conformando así un patosistema esquematizado en un tetraedro (Figura 1-2.b) (Moschini *et al.*, 2013).

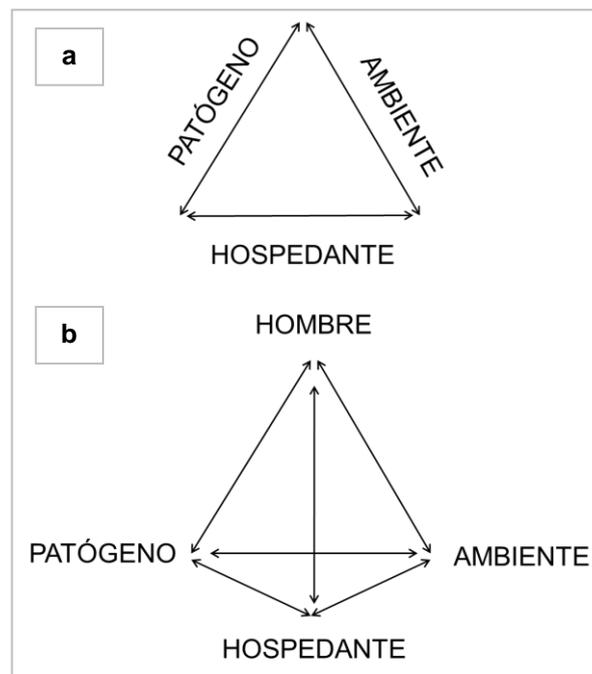


Figura 1-2. Componentes interactivos en el desarrollo de enfermedades infecciosas en plantas: (a) Triángulo de las enfermedades; (b) Tetraedro de las enfermedades (tomado de Moschini *et al.*, 2013).

Los procesos específicos que caracterizan a las enfermedades infecciosas varían considerablemente según el agente causal y la especie vegetal huésped; sin embargo, se puede generalizar que para su desarrollo ocurren una serie de eventos sucesivos que han sido esquematizados dentro del “ciclo de la enfermedad” (Figura 1-3). Allí se incluyen la inoculación, penetración, infección, invasión y colonización del

huésped por el fitopatógeno, y el crecimiento y/o reproducción, la dispersión y supervivencia de este último (Agrios, 2005). Dentro de los agentes que provocan enfermedades en las plantas, los hongos se destacan por ser el grupo más numeroso y variado. Se estima que alrededor de 8.000 especies diferentes pueden causar unas 80.000 enfermedades vegetales (Castaño Zapata, 2015). Por otro lado, de acuerdo a Agrios (2005), se han encontrado cerca de 80 especies de bacterias que constan de patovares que producen enfermedades en las plantas.



Figura 1-3. Ciclo de las enfermedades en las plantas (tomado de Agrios, 2005).

En la horticultura, los fitopatógenos que afectan los propágulos destinados a la implantación de los cultivos constituyen uno de los factores de mayor riesgo en este tipo de producción (Hartmann *et al.*, 1997). En tal sentido se debe considerar que, durante la germinación, la emergencia y el desarrollo inicial, las plántulas son especialmente susceptibles a la infección de patógenos, debido a que los exudados

liberados durante la germinación proveen a los microorganismos una base nutritiva que facilita la patogénesis, y a que los tejidos jóvenes tienen una escasa estructura constitutiva para su protección (Tsedaley, 2015).

1-4.1. *Penicillium allii* causante de la mufa del ajo

La mufa del ajo (*Allium sativum*), también conocida como decaimiento o moho verde de la mencionada hortaliza, es causada por el fitopatógeno *Penicillium allii*. Esta enfermedad es de distribución mundial y ocasiona importantes pérdidas durante la implantación del cultivo y la postcosecha (Valdez *et al.*, 2009; Gálvez y Palmero, 2021). El signo característico es la presencia de moho verde azulado sobre los bulbillos. Las plantas provenientes de propágulos infectados pueden morir durante la brotación o en el transcurso de su crecimiento, lo que se traduce en un menor rendimiento del cultivo. El ataque de este fitopatógeno es muy frecuente, ya que es capaz de crecer en condiciones muy amplias de humedad y temperatura (Burba, 2003). En la actualidad, se trata de forma preventiva mediante la aplicación de fungicidas sintéticos a los bulbillos destinados a la implantación del cultivo (Salinas y Cavaganaro, 2019).

1-4.2. *Sclerotinia sclerotiorum* causante de la podredumbre blanca en poroto

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary es un hongo polífago y necrótrofo ampliamente reconocido, ya que causa la podredumbre y muerte de numerosos cultivos intensivos y extensivos, así como de malezas y especies silvestres. Se caracteriza por presentar abundante micelio blanco algodonoso sobre los tejidos vegetales que afecta, y por formar esclerocios oscuros que actúan como estructuras de resistencia. Entre sus huéspedes se encuentran la lechuga (*Lactuca sativa*), el girasol (*Helianthus annuus*), la soja (*Glycine max*), entre otros (Purdy, 1979; Delhey *et al.*, 2009; Smolińska y Kowalska, 2018). En el cultivo de poroto (*Phaseolus* sp.) puede contaminar e infectar a las semillas, plántulas, plantas y frutos, ocasionando graves pérdidas en la producción (Tu, 1988; Abán *et al.*, 2019; SINAVIMO, 2022). El control de *S. sclerotiorum* en el mencionado cultivo es complejo, predominando actualmente el uso de fungicidas sintéticos (Teixeira *et al.*, 2019).

1-4.3. Bacterias fitopatógenas

Las enfermedades bacterianas pueden limitar de forma significativa la producción de los cultivos hortícolas, ya sea que se realiza en invernadero o a campo abierto (Sampietro *et al.*, 2016). La mayoría de las bacterias fitopatógenas son bacilos Gram-negativos, aunque también hay géneros de bacterias Gram-positivas, que

pueden ingresar en las semillas, hojas, tallos o raíces a través de aberturas naturales como los estomas o las lenticelas, o ser transmitidas por insectos fitófagos (Tournas, 2005). Entre las bacterias fitopatógenas que ocasionan merms significativas en cultivos hortícolas en Argentina, se pueden citar *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata*, *P. mediterranea*, *Xanthomonas gardneri* y *X. vesicatoria* (Pérez-Pérez *et al.*, 2020; Holtappels *et al.*, 2021). Los síntomas que producen dependen del huésped y suelen incluir manchas foliares, marchitamientos, hiperplasias, costras y podredumbres blandas (Agrios, 2005).

1-5. Hipótesis y objetivos

Desde el año 2009, en el Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA) del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur y Centro Asociado de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), se ha trabajado para contribuir a la aplicación del propóleos y de los aceites esenciales en el control de fitopatógenos de interés agrícola. Producto de las investigaciones y estudios realizados, se generaron publicaciones y trabajos que, junto con el estado actual del conocimiento, llevaron a plantear la hipótesis y los objetivos de esta tesis.

• Hipótesis general

El extracto de propóleos y el aceite esencial de orégano, ambos productos naturales que contienen compuestos bioactivos derivados del metabolismo secundario vegetal, poseen propiedades antimicrobianas y fitoinhedoras con potencial para formular tratamientos sanitarios para propágulos hortícolas.

• Objetivo general

Evaluar las características de extractos de propóleos y de aceites esenciales de orégano, su actividad antimicrobiana individual y combinada sobre diversos fitopatógenos, y su acción fitoinhedoras sobre propágulos hortícolas, a fin de determinar su potencial como tratamientos sanitarios para las mencionadas estructuras vegetales.

• Objetivos específicos

1. Caracterizar sensorial, física y químicamente propóleos provenientes de distintas regiones de Argentina, determinar el perfil químico de aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.), y comprobar la presencia de compuestos bioactivos derivados del metabolismo secundario vegetal en ambos.

2. Caracterizar morfológica y genotípicamente cepas de los fitopatógenos *Penicillium allii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata*, *P. mediterranea*, *Xanthomonas gardneri* y *X. vesicatoria*.

3. Determinar *in vitro* las propiedades antifúngicas del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano, tanto de forma individual como combinada, sobre *P. allii* y *S. sclerotiorum*, así como la actividad antibacteriana del extracto de propóleos sobre bacterias fitopatógenas.

4. Evaluar la actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre propágulos hortícolas.

5. Probar *in vivo* la acción antifúngica del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano, tanto de forma individual como combinada, frente a la mufa del ajo causada por *P. allii* en bulbillos destinados a la implantación del cultivo, y frente al moho blanco causado por *S. sclerotiorum* en semillas de poroto pallares.

1-6. Esquema de trabajo

Esta tesis se estructuró en siete capítulos, que responden a las etapas que se siguieron para el desarrollo de la investigación (Figura 1-4). El esquema de trabajo estuvo en concordancia con lo propuesto por Lengai y Muthomi (2018), para desarrollar biopesticidas de uso agrícola.

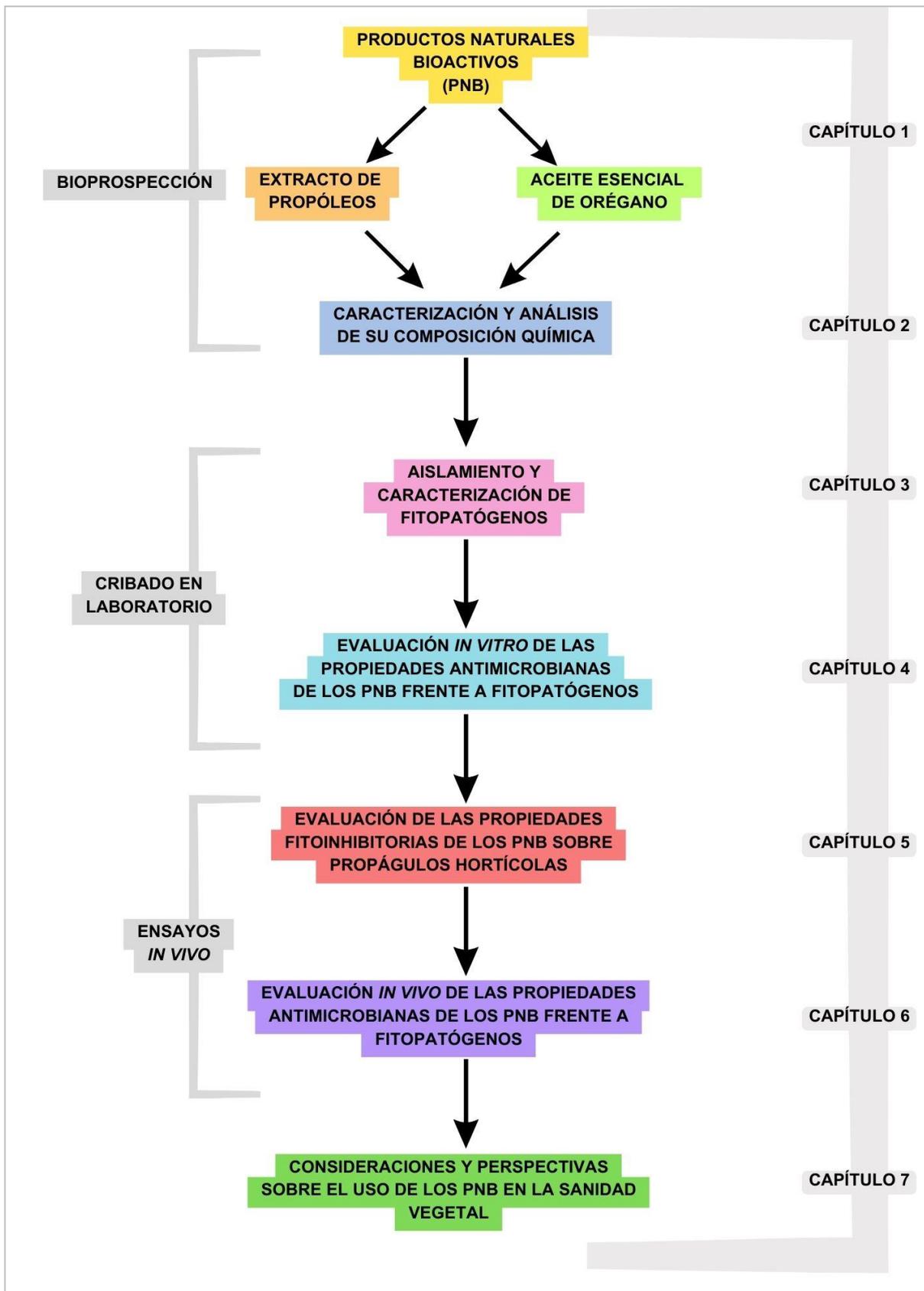


Figura 1-4. Esquema de trabajo para esta tesis doctoral, adaptado de Lengai y Muthomi (2018).

CAPÍTULO 2 - Caracterización de productos naturales bioactivos: propóleos y aceite esencial de orégano

2-1. Introducción

El propóleos y los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas, como el orégano, se han convertido en una alternativa de gran interés para el control de fitopatógenos. Esto es debido a que, en su composición, presentan metabolitos secundarios vegetales que les otorgan propiedades antimicrobianas (Godlewska *et al.*, 2021). El estudio de estos productos suele comenzar con su caracterización física y química durante el proceso de bioprospección, lo que incluye la identificación y cuantificación de los principales compuestos bioactivos (Lengai y Muthomi, 2018).

El propóleos es considerado un producto natural bioactivo (PNB) de origen mixto vegetal-animal ya que es elaborado por las abejas (*Apis mellifera* L.) a partir de exudados vegetales (Ghisalberti, 1979; Álvarez, 2012). Las pecoreadoras de la colmena detectan, a través de sus antenas, sustancias resinosas, gomosas y/o balsámicas, que son secretadas y/o exudadas por determinadas especies botánicas. Luego, de forma selectiva en base a la proximidad, disponibilidad, aptitud y toxicidad, recolectan dicha materia prima valiéndose de sus mandíbulas, de secreciones salivares-mandibulares propias, como el ácido 10-hidroxidecenoico, y del primer par de patas (Salatino y Salatino, 2017; Dezmirean *et al.*, 2021). Seguidamente, forman pequeños gránulos de propóleos que transportan a la colonia en sus corbículas. Las abejas realizan la recolección y elaboración de este producto en días calurosos, con temperaturas superiores a 20 °C, ya que las resinas vegetales se encuentran fácilmente maleables (Bedascarrasbure *et al.*, 2006).

Dentro de la colmena, el propóleos es utilizado como barniz antimicrobiano para las celdas, el piso y las paredes, como sustancia embalsamante para evitar la descomposición de los restos de animales invasores y como material térmico aislante. Estas funciones resultan fundamentales para la higiene de la colonia, ya que en el reducido espacio físico de una colmena habitan entre 40.000 y 80.000 individuos, con una temperatura de 35 °C promedio y una humedad relativa que varía entre el 40 % y 60 %, lo que constituye un ambiente propicio para el desarrollo de microorganismos (Simone-Finstrom y Spivak, 2010).

En cuanto a las características, es un material lipofílico, sólido, duro y frágil si se encuentra frío, tornándose blando, flexible y pegajoso a medida que aumenta la temperatura. Su coloración puede presentar tonalidades amarillas, verdosas, rojizas y amarronadas (Wagh, 2013). Desde el punto de vista químico, es una sustancia compleja y variable, en cuya composición se encuentran resinas (50 %), ceras (30 %),

ácidos aromáticos y sus correspondientes ésteres (10 %) y polen (5 %), además de otros compuestos e impurezas (5 %) (Toreti *et al.*, 2013). Dentro de la fracción correspondiente a las resinas, se pueden identificar un gran número de metabolitos secundarios vegetales, principalmente del grupo de los compuestos fenólicos, que le otorgan a este producto propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiprotozoarias, antioxidantes, antiinflamatorias, cicatrizantes, antitumorales (Bankova, 2005b; Anjum *et al.*, 2019), y fitoinhedoras (Dadgostar y Nozari, 2020) entre otras.

Los apicultores cuentan con varios métodos para recolectar propóleos, siendo los más utilizados el raspado del material apícola y las mallas plásticas colocadas en la parte superior de la última alza (Figura 2-1). En general se cosechan entre 100 y 200 gramos de propóleos por colmena al año, aunque esta cantidad puede ser superior en algunos sitios geográficos alcanzando los 1000 gramos de propóleos por colmena al año. En Argentina la producción de propóleos se realiza de forma complementaria a la producción de miel (principal producto obtenido de la actividad apícola), y es posible observar propóleos con diferentes características debido a la diversidad de especies vegetales que se encuentran a lo largo del territorio nacional (García Paoloni, 2022).



Figura 2-1. Propóleos: (a y b) alza de una colmena apícola con los bordes propolizados; (c) pinza con palanca, utilizada por los apicultores para raspar propóleos del material apícola (alzas, cuadros, etc.); (d) malla plástica matrizada con propóleos, luego de ser retirada de una colmena.

El orégano (Familia *Lamiaceae*, Género *Origanum*), es mundialmente conocido por su aptitud como planta aromática y condimentaria (Figura 2-2.a). Se caracteriza por ser fuente de aceites esenciales con características sensoriales particulares, que habitualmente se usan para conferir gustos, aromas y/o colores a los alimentos y bebidas (Arcila-Lozano *et al.*, 2004). Debido a las propiedades bioactivas que poseen los metabolitos secundarios del orégano, es también considerado una “planta medicinal” cuyos extractos y aceites esenciales tienen utilidad farmacológica (Chisht *et al.*, 2013).

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano y de los PNB que se obtienen de él. En los aceites esenciales (Figura 2-2.b) se han identificado flavonoides, monoterpenos y sesquiterpenos, siendo característicos el carvacrol y el timol (Rostro-Alanis *et al.*, 2020). Los tipos de compuestos y su concentración pueden variar debido a numerosos factores, como el genotipo de orégano utilizado, las condiciones de cultivo, el ataque de plagas, la época de cosecha, el método de obtención del aceite esencial, entre otros (Tibaldi *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2022). Las propiedades de este producto incluyen actividad antioxidante (Quiroga *et al.*, 2013), antimicrobiana (Rodríguez-García *et al.*, 2015), antiparasitaria (Bouyahya *et al.*, 2017), insecticida, estrogénica, antígenotóxica y antiinflamatoria (Arcila-Lozano *et al.*, 2004).



Figura 2-2. Cultivo y aceite esencial de orégano: (a) parcela experimental de orégano en el Depto. de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina; (b) aceite esencial de orégano obtenido de *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*, tipo comercial compacto.

En Argentina se encuentra documentada la presencia de *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*, *O. majorana* L., *O. vulgare* ssp. *virens*, *O. x applii*, *O. x majoricum*

(Rouquaud y Videla, 2000) y *O. vulgare* spp. *hirtum* (Torres, 2011). A nivel nacional, la producción de orégano es de gran relevancia en cuanto a la superficie cultivada y el volumen de material vegetal exportado respecto de otras hierbas aromáticas (Ciancaglini, 2020; Laurlund, 2021). Las principales zonas de cultivo son el departamento de San Carlos en la provincia de Mendoza, y los departamentos San Javier y San Alberto en la provincia de Córdoba. También, en menor medida, se produce orégano en el departamento de Calingasta, San Juan, y en el Valle de Lerma, Salta. En la provincia de Buenos Aires se suele cultivar en los cordones hortícolas de las grandes ciudades. En cuanto a la producción de aceites esenciales, ésta es realizada por pequeños productores o cooperativas regionales, existiendo una demanda creciente que contribuye al agregado de valor en origen (Moreno *et al.*, 2011).

Dado que la composición química de los PNB se encuentra estrechamente relacionada con sus propiedades, la caracterización de los mismos resulta fundamental para determinar su potencial aplicación como biopesticidas para uso agrícola (Lengai y Muthomi, 2018). Por tal motivo, los objetivos de este capítulo fueron:

- Caracterizar sensorial, física y químicamente muestras de propóleos provenientes de distintas regiones de Argentina;
- Determinar la composición química de distintos aceites esenciales obtenidos de orégano (*Origanum vulgare* L.);
- Comprobar la presencia de metabolitos secundarios vegetales en ambos productos naturales, a fin de considerarlos para evaluaciones posteriores sobre sus propiedades bioactivas.

2-2. Materiales y métodos

2-2.1. Caracterización de muestras de propóleos en bruto y sus extractos

2-2.1.1. Origen y caracterización sensorial, física y química de propóleos en bruto

La información sobre el origen de los propóleos en bruto (P), denominados P₁, P₂, P₃ y P₄, se resume en la Tabla 2-1. Las muestras se mantuvieron almacenadas al abrigo de la luz y a bajas temperaturas (-15 ± 2 °C). Para su caracterización física y química, se siguió la metodología propuesta por la norma IRAM-INTA 15935-1 de propóleos en bruto, con algunas modificaciones. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

a. *Análisis sensorial*: se realizaron pruebas descriptivas del aroma, color, gusto, sensaciones en boca, consistencia, aspecto e impurezas visibles con un panel de diez personas semi-entrenadas. Para ello, partes representativas de las muestras se colocaron en frascos de vidrio con tapa a rosca, identificados y se mantuvieron a 25 ± 2 °C durante las 72 h previas a la evaluación (Lozina *et al.*, 2010). Adicionalmente, para determinar el perfil aromático de las muestras, se utilizó la rueda de aromas de mieles propuesta por Piana *et al.* (2004).

b. *Sustancias extraíbles en n-hexano (ceras)*: se trabajó con un equipo extractor Soxhlet, en el cual se colocaron cartuchos de papel de filtro que contenían aproximadamente 2 g de propóleos acondicionado. Se utilizó como reactivo n-hexano (98,5 %, Anedra). El porcentaje de ceras (E %), se calculó mediante la fórmula:

$$E \% = \frac{(Bc1 - Bc0)}{m} \times 100$$

donde Bc1 es la masa del balón seco con cera (g), Bc0 la masa del balón seco y vacío (g) y m la masa de la muestra (g).

c. *Pérdidas por calentamiento*: se colocaron 4 g de cada muestra en cápsulas previamente pesadas, que se llevaron a estufa a 100 ± 2 °C hasta eliminar completamente la humedad, lo cual se verificó cuando dos pesadas sucesivas no difirieron entre sí en más de 5 mg. Una vez retiradas de la estufa, las cápsulas se dejaron en un desecador hasta que fueron pesadas en una balanza analítica. Las pérdidas por calentamiento (H %) se calcularon aplicando la siguiente fórmula:

$$H \% = \frac{[1 - (CTS - T)]}{(CTH - T)} \times 100$$

donde CTS es la masa de la cápsula con la muestra seca (g), CTH la masa de la cápsula con la muestra en bruto (g) y T la masa de la cápsula vacía (g).

d. *Cenizas*: las muestras secas, luego de haberse efectuado la determinación de pérdidas por calentamiento (2-2.1.c.), se colocaron en un horno de mufla para su incineración a 520 ± 25 °C, hasta que fueron reducidas a cenizas blancas. Posteriormente, los crisoles se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron. El contenido de cenizas (C %) se calculó aplicando la fórmula:

$$C \% = \frac{(Cz - T)}{(CPh - T)} \times 100$$

dónde Cz es la masa del crisol con cenizas (g), CPh la masa del crisol con la muestra en bruto (g) y T la masa de la cápsula vacía (g).

e. *Punto de fusión:* se utilizó un microscopio integrado a una platina de calentamiento con termómetro de mercurio, sobre el cual se colocó una fracción mínima de propóleos molido en un cubreobjetos. Se observó el rango de temperaturas desde el comienzo hasta el final de la fusión y se determinó la temperatura media como el promedio de ambas mediciones (Chaillou *et al.*, 2009).

Tabla 2-1. Identificación e información sobre el origen de los propóleos en bruto (P), analizados y utilizados para elaborar los extractos hidroalcohólicos. Todas las muestras fueron recolectadas en Argentina.

Muestra	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
Localidad y provincia de origen	Río Colorado, Provincia de Río Negro (36°09'02"S 70°23'47"O)	Carmen de Patagones, Provincia de Buenos Aires (40°47'S 62°58'O)	Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires (38°43'S 62°16'O)	Luján de Cuyo, Provincia de Mendoza (33°01'S 68°52'O)
Año de recolección	2014	2015	2015	2012
Método de recolección	Raspado	Raspado y mallas plásticas matrizadas	Mallas plásticas matrizadas	Raspado y mallas plásticas matrizadas
Principales especies arbóreas encontradas en cercanías del apiario	Álamos (<i>Populus</i> sp.), sauces (<i>Salix</i> sp.), manzanos (<i>Malus domestica</i>), durazneros (<i>Prunus persica</i>) y perales (<i>Pyrus communis</i>)		Pinos (<i>Pinus</i> sp.), cipreses (<i>Cupressus</i> sp.), calocedros (<i>Calocedrus decurrens</i>), ciruelos de jardín (<i>Prunus cerasifera</i>) y eucaliptos (<i>Eucalyptus</i> sp.). También álamos (<i>Populus</i> sp.) y sauces (<i>Salix</i> sp.)	Álamos (<i>Populus</i> sp.) y sauces (<i>Salix</i> sp.)
Observaciones	Donación de apicultores que comercializan propóleos		Procedente del apiario experimental del LabEA - UNS	Donación de apicultores que comercializan propóleos

2-2.1.2. Elaboración y caracterización de extractos de propóleos

A partir de cada muestra de propóleos, se elaboraron extractos hidroalcohólicos (EP) que fueron consecuentemente denominados: EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄. Para ello se colocaron 10 g de propóleos molido en 100 mL de hidroalcohol (70:30 alcohol etílico en agua destilada). La mezcla se llevó a estufa a 40 ± 2 °C con agitación magnética continua durante 24 h. La solución resultante se filtró para retener impurezas con papel tipo Whatman n° 40. Los extractos obtenidos se conservaron en frascos color ámbar, al resguardo de la luz y a bajas temperaturas (entre 3 °C y 5 °C) (Figura 2-3).

Los parámetros extracto seco, índice de oxidación, contenido de fenoles y flavonoides totales de los EP, se caracterizaron de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-2 de extractos de propóleos, con modificaciones. Cada determinación se realizó por triplicado. También se realizaron las curvas espectrofotométricas y se analizó el perfil de polifenoles de cada extracto.

a. *Extracto seco*: se colocaron 20 mL de EP en una cápsula de porcelana previamente pesada, que se llevaron a estufa a 100 ± 2 °C durante 24 h. Luego, las cápsulas se dejaron enfriar en un desecador, se pesaron y se calculó el extracto seco (ES %) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ES \%} = \frac{m_1 - m_0}{m_2} \times 100$$

donde m_0 es la masa de la cápsula de porcelana (g), m_1 es la masa de la cápsula más el residuo seco (g) y m_2 es la masa de la muestra (g).

b. *Compuestos fenólicos totales*: el contenido de fenoles totales se determinó por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto de propóleos. Para ello, se tomaron 0,5 mL de una dilución 1:10 de los EP en etanol al 70 % (v/v), se le adicionaron 0,5 mL de Reactivo Folin-Ciocalteu (Biopack, Argentina), 2 mL de carbonato de sodio (Cicarelli, Argentina) al 15,9 % (p/v) y agua destilada, hasta llevar a un volumen final de 10 mL. Luego de dejar reaccionar dicha solución por 5 min en un baño termostatzado (a 50 ± 2 °C), se realizaron lecturas a 755 nm en un espectrofotómetro Agilent Cary 60 UV-VIS. Paralelamente, se realizó la curva de calibración con concentraciones desde 1 a 5 mg L⁻¹ de ácido gálico (98 %, Sigma-Aldrich), a partir de una solución patrón de ácido gálico 0,5 mg mL⁻¹.

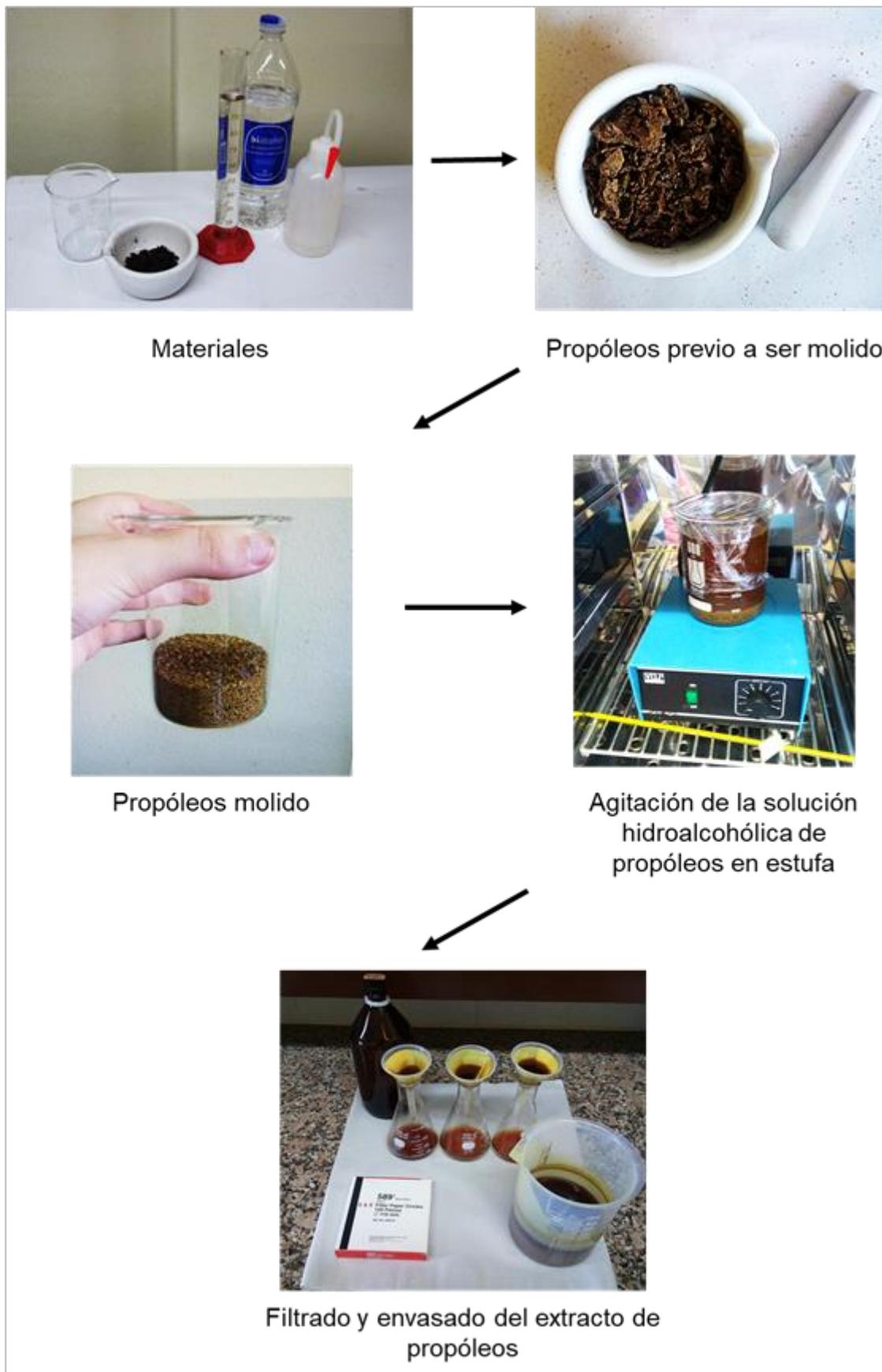


Figura 2-3. Elaboración de extractos hidroalcohólicos de propóleos.

c. *Flavonoides totales*: el contenido de flavonoides se determinó por el método espectrofotométrico con cloruro de aluminio y se expresó como mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto de propóleos. Para esto, a una alícuota de 50 μL de cada EP se le agregaron 0,5 mL de una solución de tricloruro de aluminio (Carlo Erba, España) al 5 % (p/v) y metanol (Cicarelli, Argentina) hasta llevar a volumen final de 10 mL. Luego se dejó reaccionar por 30 min en oscuridad y se tomaron las lecturas correspondientes a 454 nm en un espectrómetro (Cary 60 UV-VIS, Agilent). La curva de calibración se realizó con soluciones de referencia de quercetina (95 %, Sigma-Aldrich) en metanol, con concentraciones entre 1,012 y 8,09 mg L^{-1} , preparadas a partir de una solución patrón de quercetina en metanol de 1 mg mL^{-1} .

d. *Índice de oxidación*: se tomaron 2 mL de EP que se agregaron a 100 mL de agua destilada. Dicha dilución se agitó constantemente durante unos minutos y se filtró. Del filtrado recuperado se tomaron 2 mL y se les añadió 1 mL de ácido sulfúrico (98 %, Anedra). Luego se continuó agitando y se agregaron 0,05 mL de permanganato de potasio 0,1 N (Cicarelli, Argentina). Durante este último paso, se cronometró con suma precisión el tiempo desde que la gota del reactivo entró en contacto con la solución, hasta que la misma quedó decolorada, estableciéndose así el índice de oxidación.

e. *Curvas espectrofotométricas UV-VIS*: los EP se diluyeron con etanol al 70 % (v/v) hasta leer valores de absorbancia entre 0,5 y 0,8 unidades a 290 nm. Posteriormente, se efectuó un barrido completo de longitudes de onda a intervalos de 10 nm, desde 240 hasta 420 nm. Además, se evaluó la presencia de picos máximos de absorbancia entre 270 y 315 nm (Bedascarrasbure *et al.*, 2004). Se empleó un espectrofotómetro (Lambda 265 UV-VIS, Perkin Elmer) y cubetas de cuarzo.

f. *Perfil de polifenoles*: se determinó por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC), equipada con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Para esto, se utilizó un sistema de HPLC-PDA Waters 600, equipado con una columna analítica S5 ODS2 (250 x 4.6 mm de diámetro interno, 5 μm de tamaño de partícula; KONIK Instruments S.A., España), y con un detector UV de longitud de onda fija (290 nm). Como fases móviles se emplearon una solución acuosa con 0,1% de H_3PO_4 (A) y acetonitrilo con 0,1 % H_3PO_4 (B). El volumen inyectado fue de 10 μL , con un tiempo de inyección de 50 min. Los gradientes de las fases móviles tuvieron una velocidad de flujo de 0,5 mL min^{-1} , con bomba binaria a 25 °C (Tabla 2-2).

Tabla 2-2. Gradiente de las fases móviles del HPLC, compuesta por una solución acuosa con H₃PO₄ al 0,1% (A) y acetonitrilo con 0,1 % H₃PO₄ (B).

Tiempo (min)	% A	% B
0	60	40
27	60	40
28	40	60
38	40	60
40	30	70
50	60	40

Los componentes principales de los extractos de propóleos se identificaron mediante comparación con los tiempos de retención de los estándares.

Los reactivos utilizados durante la determinación fueron: ácido fosfórico (EM SCIENCE, España), acetonitrilo (grado de gradiente de HPLC para cromatografía líquida, U.V.E.) y agua ultra purificada Milli-Q (Millipore, EE. UU.). Todos los disolventes se desgasificaron mediante filtración a través de membranas de PTFE, de 0,2 µm, antes de su uso. Las muestras y los estándares también fueron previamente filtrados con membranas de politetrafluoroetileno, que tenían un diámetro 13 mm y tamaño de poro de 0,2 µm.

Adicionalmente, se amplió el estudio del perfil químico de polifenoles del EP₁ (muestra utilizada en estudios *in vitro* e *in vivo* posteriores), por HPLC-DAD siguiendo la metodología descrita en Cibanal *et al.* (2021).

2-2.1.3. Análisis estadístico de datos

Los resultados de las determinaciones físicas y químicas de las distintas muestras de propóleos y de sus extractos se evaluaron mediante el análisis de la varianza (ANAVA). Para la comparación de medias se utilizó el test de Tukey.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010).

2-2.2. Caracterización de aceites esenciales de orégano

2-2.2.1. Origen de las muestras de orégano y obtención de aceites esenciales

La información sobre el origen de los aceites esenciales estudiados, que fueron denominados AEO₁, AEO₂ y AEO₃, así como del material vegetal y de la metodología empleada para obtenerlos, se resume en la Tabla 2-3. Estas muestras se conservaron en frascos color ámbar, al resguardo de la luz y a bajas temperaturas (entre 3 °C y 5 °C).

2-2.2.2. Caracterización química de los aceites esenciales

Se determinó la composición química de los AEO por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), adaptando la metodología propuesta por Mohammed *et al.* (2020). Para esto se utilizó un cromatógrafo de gases (5977A, Agilent), acoplado a un espectrómetro de masas (7890B, Agilent), equipado con una columna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espesor de película), utilizando helio como gas carrier, con un flujo de 1 mL min⁻¹. La temperatura del horno GC se mantuvo a 50 °C durante 3 min, se programó a 5 °C min⁻¹ hasta 180 °C, luego se mantuvo a esta temperatura durante 1 min y se aumentó nuevamente a 50 °C min⁻¹ hasta 280 °C. Los espectros de masa se registraron en la modalidad de impacto electrónico (EI) a 70 eV, en un rango de masas de m/z 35 - 500 uma. La temperatura del bloque de inyección fue de 250 °C. Las condiciones óptimas para el análisis por CG-MS se determinaron previamente en un cromatógrafo (G14B, Shimadzu), con un detector de ionización de llama y una columna HP-5 (25 m x 0,20 mm, 0,33 µm de espesor de la película). Asimismo, se realizó la determinación de los índices de retención (Índice Kovats, IK) de los componentes en la columna HP-5 y la comparación de estos con trabajos científicos. La identidad de los picos de los cromatogramas obtenidos mediante análisis de GC-MS se corroboró mediante la comparación de los espectros de masa con los almacenados en la base de datos del equipo (MS NBS75K.L DATOS), y la bibliografía.

Tabla 2-3. Identificación e información sobre el origen de los aceites esenciales de orégano (AEO). Todas las muestras fueron obtenidas en Argentina.

Muestra	AEO ₁	AEO ₂	AEO ₃
Localidad y provincia de origen del material vegetal	INTA Hilario Ascasubi, Provincia de Buenos Aires (39°23'33"S 62°37'44"O)	Azul, Provincia de Buenos Aires (36°44'34.5"S 59°57'21.5"O)	Gral. Fernández Oro, Provincia de Río Negro (38°59'21.0"S 67°55'00.7"O)
Variedad de orégano	<i>Origanum vulgare</i> L. cv. Alpa Sumaj FCA-INTA	<i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>hirtum</i> (Link) letsvaart (tipo comercial criollo)	<i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>vulgare</i> L., (tipo comercial compacto)
Órgano vegetal utilizado para obtener el AEO	Hojas y tallos (secos)		
Año de recolección del material vegetal	2017	2018	2021
Método de obtención del AEO	Destilación por arrastre de vapor en equipo Clevenger		
Observaciones sobre el AEO	Donación de un proyecto de investigación científico de la UNS	Obtenido del emprendimiento privado "Skúa"	Obtenido de la cooperativa agraria de producción agroecológica "Aromáticas Alto Valle"

2-3. Resultados y discusión

2-3.1. Caracterización de muestras de propóleos en bruto y sus extractos

Los resultados de la caracterización de los propóleos en bruto se presentan en la Tabla 2-4.a. En el análisis sensorial, los aromas encontrados en todas las muestras de propóleos fueron propios de la naturaleza de este producto (resinoso). Adicionalmente, en P₄ se detectaron notas aromáticas de la familia químico (Pianna *et al.*, 2004). Todos los propóleos presentaron gusto amargo y coloración amarronada con distintos tintes (Figura 2-4). Se evidenciaron diferencias en la consistencia y el aspecto. El contenido de impurezas visibles fue inferior al 5 % en todos los casos, encontrando entre ellas astillas de madera, restos de panales y partes de abeja. Estos resultados fueron consistentes con caracterizaciones sensoriales de propóleos encontradas en la bibliografía nacional e internacional (Bedascarrasbure *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2012). El estudio de estos parámetros resulta de interés para la estandarización y utilización de este producto (Pobiega *et al.*, 2019; Habryka *et al.*, 2020). De acuerdo a Wagh (2013), las características sensoriales del propóleos dependen principalmente de las resinas vegetales utilizadas en su elaboración. En tal sentido, P₁ y P₂ presentaron una gran semejanza atribuible al origen botánico similar, y se distinguieron del resto de las muestras que fueron obtenidas en otras localidades argentinas (Tabla 2-1). P₃ se destacó por presentar brillo y una mayor dureza, lo que estaría asociado a la abundancia de especies de coníferas en el entorno del colmenar (Dias *et al.*, 2012). El aroma químico, particular de P₄, podría provenir de compuestos propios de la muestra o que fueron incorporados en la manipulación postcosecha.

En relación al contenido de ceras, las muestras presentaron valores comprendidos dentro de la tolerancia establecida por la norma argentina IRAM-INTA 15935-1 de propóleos, que fija un máximo del 35 %. A su vez, estos resultados fueron concordantes con los reportes de distintos autores (Lacalle *et al.*, 2008; Palomino García *et al.*, 2010; Salatino y Salatino, 2021). P₃ se destacó por presentar un contenido significativamente bajo de ceras, mientras que P₁ y P₂ presentaron valores superiores ($p < 0,05$). Estas diferencias podrían ser atribuidas a los métodos de cosecha utilizados en cada caso y a la disponibilidad de resinas en la flora cercana a los apiarios (Tabla 2-1). De acuerdo a Vázquez (2011), la recolección de propóleos por raspado incrementa el riesgo de adicionarle ceras e impurezas, que se evita mediante el uso de mallas plásticas matrizadas. Silva *et al.* (2006) postularon que las abejas adicionan mayor cantidad de ceras al propóleos cuando la oferta de resinas vegetales es baja. En este producto, la cera proviene de secreciones de las abejas y está compuesta principalmente por ácidos grasos libres y alcoholes primarios, careciendo

de compuestos fenólicos y por lo tanto de bioactividad (Negri *et al.*, 1998; Bankova *et al.*, 2000). Un bajo contenido de ceras ha sido correlacionado con un alto contenido de resinas (Figueiredo *et al.*, 2015), las cuales tienen origen botánico y son la fuente de los principales compuestos bioactivos (Salatino *et al.*, 2011).



Figura 2-4. Muestras de propóleos (P) recolectadas en distintas zonas de Argentina: Río Colorado, Pcia. de Río Negro (P₁), Carmen de Patagones, Pcia. de Buenos Aires (P₂), Bahía Blanca, Pcia. de Buenos Aires (P₃), Luján de Cuyo, Pcia. de Mendoza (P₄).

Las pérdidas por calentamiento se encontraron en el rango de 1,04 % a 1,46 %. Estos valores fueron inferiores a los reportados por otros autores (Bonvehí y Coll, 2000; Sosa-López *et al.*, 2000; Bedascarrasbure *et al.*, 2004; Gallardo *et al.*, 2020), lo cual podría deberse a que las muestras fueron obtenidas en regiones áridas, y a que su almacenamiento se realizó en un ambiente seco durante un periodo de tiempo relativamente largo (mayor a 3 años en todos los casos). Este parámetro es indicativo del contenido de humedad, factor determinante para la preservación del propóleos, ya que un exceso de agua podría conducir a reacciones de hidrólisis en las moléculas bioactivas y favorecer el crecimiento de microorganismos (Martínez Galán, 2009).

En cuanto al contenido de cenizas, P₁ y P₃ presentaron valores inferiores al 2 %, y cercanos a los reportados en otros estudios (Funari y Ferro, 2006; Lozina *et al.*,

2010). P₂ y P₄ mostraron un contenido de cenizas estadísticamente superior ($p < 0,05$). Angulo Vaca (2014) encontró que muestras de propóleos obtenidas en las zonas de Socorro y Nítiluisa, Provincia de Chimborazo, Ecuador, contenían más de un 6 % de cenizas, lo cual atribuyó a que, en determinadas ocasiones, las abejas adicionan al propóleos diversos materiales, como lodo y astillas de maderas, para brindarle mayor consistencia.

Los rangos de temperaturas desde el comienzo hasta el final de la fusión fueron: 61-73 °C para P₁, 56-70 °C para P₂, 64-71 °C para P₃ y 62-65 °C para P₄. La consistencia del propóleos a temperatura ambiente es una característica valorada desde el punto de vista comercial. La mayoría de las muestras pasan al estado líquido entre los 60 y 70 °C (Chaillou *et al.*, 2009), tal como se observó en este estudio. Es destacable que P₁ y P₃ se diferenciaron estadísticamente de P₂ y P₄ en el contenido de cenizas y en el punto de fusión ($p < 0,05$), lo cual podría estar asociado a los materiales que las abejas adicionaron al propóleos en ambos casos.

En la Tabla 2-4.b se muestran los resultados de las determinaciones realizadas a los extractos hidroalcohólicos de propóleos. EP₃ se destacó por presentar el valor más alto de extracto seco y de contenido de fenoles. La variable flavonoides totales diferenció a EP₁ y EP₃ por sus valores estadísticamente superiores, de EP₂ y EP₄ ($p < 0,05$). En cuanto al índice de oxidación, si bien todos los extractos presentaron valores en el rango de 2 a 5 segundos, se observaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre ellos.

Las normas para extractos etanólicos de propóleos de Argentina y de Brasil fijan un mínimo del 10 % y 11 % para el extracto seco, respectivamente. Estos valores son superiores a los determinados en las muestras analizadas, lo cual podría deberse a que el solvente utilizado en las mismas fue hidroalcohol (70:30 alcohol etílico en agua destilada) (Talero *et al.*, 2012). La elección de dicho extractante ha sido respaldada por los estudios de Woisky y Salatino (1998) y Da Silva Frozza *et al.* (2013), quienes indicaron que es capaz de solubilizar fenoles, así como otros compuestos bioactivos presentes en el propóleos, en cantidades considerables, reduciendo los efectos indeseables del etanol puro sobre los tejidos vivos. De todas formas, al utilizar hidroalcohol, se debe considerar que un mayor contenido de agua disminuye la eficiencia de extracción, ya que las resinas vegetales son hidrofóbicas (Maroof y Gan, 2020; Šuran *et al.*, 2021).

Tabla 2-4. Características sensoriales, físicas y químicas de muestras de (a) propóleos en bruto (P) y (b) sus extractos hidroalcohólicos (EP), provenientes de distintas regiones de Argentina.

a. Propóleos en bruto				
	P₁	P₂	P₃	P₄
Aroma	Resinoso, fuerte	Resinoso, fuerte	Resinoso, suave	Aromático, químico
Color	Marrón oscuro, amarillento	Marrón oscuro, amarillento	Marrón claro, rojo, amarillento	Marrón claro, verdoso
Gustos y sensaciones en boca	Amargo, picante	Amargo, picante	Amargo	Amargo, picante
Consistencia	Poco blanda	Poco blanda	Dura	Poco blanda
Aspecto	Trozos irregulares	Trozos irregulares	Trozos irregulares	Trozos irregulares
Sustancias extraíbles en n-hexano (%)	31,16 ± 3,16 a ^a	31,01 ± 2,85 a	9,43 ± 0,84 b	23,36 ± 3,08 a
Pérdidas por calentamiento (%)	1,22 ± 0,10 ab	1,46 ± 0,04 a	1,43 ± 0,23 a	1,04 ± 0,06 b
Cenizas (%)	1,93 ± 0,01 a	6,35 ± 0,83 b	0,98 ± 0,96 a	7,18 ± 0,44 b
Punto de fusión (°C)	67,33 ± 0,57 a	63,16 ± 0,28 b	67,5 ± 0,76 a	63,5 ± 1,04 b
b. Extractos hidroalcohólicos				
	EP₁	EP₂	EP₃	EP₄
Extracto seco (%)	7,87 ± 0,42 a b	6,60 ± 0,60 a	9,30 ± 0,11 b	5,50 ± 0,30 a
Contenido de fenoles (mg eq gálico/g propóleos)	28,64 ± 0,17 a	24,25 ± 0,88 a	53,91 ± 1,76 b	23,44 ± 4,86 a
Flavonoides totales (mg eq quercetina/g propóleos)	15,88 ± 0,42 a	12,55 ± 0,85 b	15,62 ± 0,59 a	11,23 ± 0,57 b
Índice de oxidación (s)	2,33 ± 0,57 a	3,00 ± 1,00 a b	2,25 ± 0,57 a	4,33 ± 0,50 b

^a En las determinaciones físicas y químicas, cada dato es la media de tres repeticiones ± desvío estándar. Letras diferentes en cada fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

Los fenoles y los flavonoides son los principales responsables de la actividad biológica en el propóleo (Anjum *et al.*, 2019). Los valores obtenidos en las muestras fueron acordes a los reportados en la bibliografía (Choi *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2008; Chaillou *et al.*, 2009), y notablemente superiores al mínimo establecido por las normas de Argentina y Brasil, que es de 0,25 % para extractos etanólicos en ambos casos. EP₃ se destacó por su elevado contenido de fenoles, lo que probablemente se deba a la gran disponibilidad de resinas vegetales existente en cercanías del apiario (Dezmirean *et al.*, 2021), dada por la diversidad de especies forestales que allí se encontraban (Tabla 2-1).

Los índices de oxidación fueron inferiores a los reportados por otros autores para extractos de propóleos de distintos orígenes geográficos. Chaillou *et al.* (2009) encontraron valores de hasta 18 s para este parámetro en extractos de propóleos recolectados en Santiago del Estero, Argentina. Por su parte, Angulo Vaca (2014) obtuvieron índices de oxidación de entre 122 y 133 s en muestras obtenidas en Ecuador. Este parámetro es un indicador de calidad, ya que mantiene una relación inversamente proporcional al contenido de compuestos fenólicos (Moreira *et al.*, 2008), tal como se observó en este estudio.

Los análisis del espectro de absorción UV-VIS de los EP se presentan en la Figura 2-5. Todos los extractos exhibieron una banda amplia de absorción entre 240 y 340 nm, con máximos cercanos a los 290 nm y una banda levemente insinuada entre los 320 y 330 nm, indicando la presencia de compuestos fenólicos, más precisamente de flavonoides. Las curvas obtenidas fueron similares a las descritas por Bedascarrasbure *et al.* (2004) para propóleos argentinos. Cabe destacar, que esta determinación resultó sencilla y rápida de realizar, debido a que únicamente requiere como reactivo el extractante utilizado y su procedimiento es corto. De esta forma, el análisis de las curvas espectrofotométricas UV-VIS de los extractos de propóleos, resulta una técnica útil para determinar la presencia de compuestos fenólicos en las primeras instancias de su caracterización.

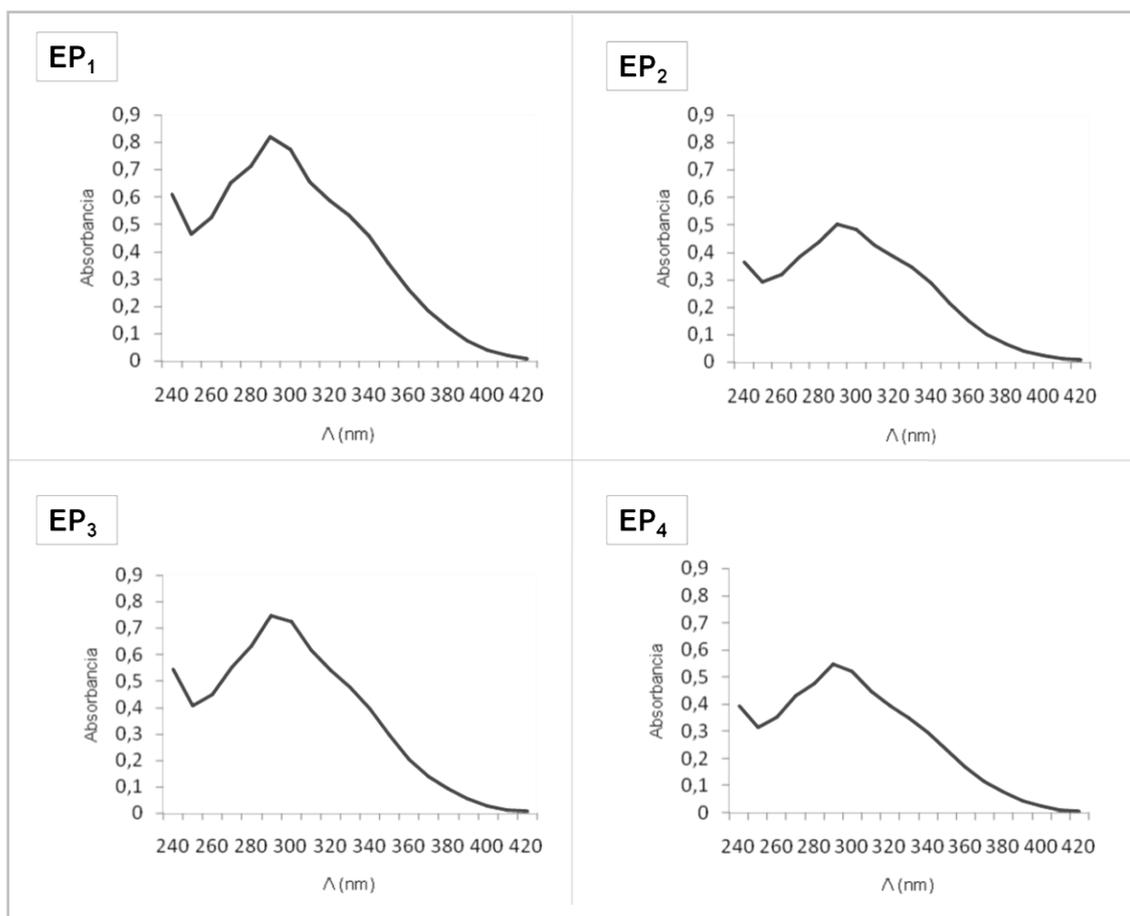


Figura 2-5. Espectro UV-VIS de extractos hidroalcohólicos de propóleos (EP), elaborados con muestras recolectadas en distintas zonas de Argentina: Río Colorado, Pcia. de Río Negro (EP₁), Carmen de Patagones, Pcia. de Buenos Aires (EP₂), Bahía Blanca, Pcia. de Buenos Aires (EP₃), Luján de Cuyo, Pcia. de Mendoza (EP₄).

El análisis cromatográfico realizado a los EP (Tabla 2-5, Figuras 2-6 y 2-7) confirmó la presencia de fenoles en todos ellos. A su vez, se observaron distintos perfiles químicos entre las muestras, que se relacionaron con diferencias en la flora de origen de los propóleos (Tabla 2-1).

El estudio de la composición química del propóleos suele ser complejo, debido a la gran diversidad de sustancias que se encuentran en él. Anjum *et al.* (2019), en su revisión, detallaron que se han reportado más de 300 compuestos en propóleos de diversas partes del mundo, incluyendo fenoles, terpenos, aminoácidos, enzimas, azúcares, vitaminas y minerales, que derivan del metabolismo secundario vegetal. Dentro de estos, es de particular interés el estudio del grupo de los fenoles, por ser numerosos y abundantes en la mayoría de las muestras, y por tener propiedades bioactivas (Santos *et al.*, 2020).

Tabla 2-5. Perfil de polifenoles analizado por HPLC-DAD de extractos hidroalcohólicos de propóleos (EP), elaborados con muestras de distintas zonas de Argentina: Río Colorado, Pcia. de Río Negro (EP₁), Carmen de Patagones, Pcia. de Buenos Aires (EP₂), Bahía Blanca, Pcia. de Buenos Aires (EP₃), Luján de Cuyo, Pcia. de Mendoza (EP₄).

Pico N°	Nombre del compuesto ^a	Índice de retención ^b	EP ₁	EP ₂	EP ₃	EP ₄
1	ácido cumárico	3,66	X ^c	X	X	X
2	ácido ferúlico	4,39	X	X	X	X
3	ácido gálico	4,88	- ^c	-	X	X
4	ácido cafeico	5,20	X	X	X	X
5	quercetina	5,88	-	-	X	X
6	apigenina	6,20	X	X	X	X
7	canferol	9,19	X	X	X	X
8	galangina	14,78	X	X	-	X

^a Los compuestos se numeraron en orden de elución en columna S5 ODS2;

^b Índice de retención de Kovats (IK);

^c la presencia del compuesto se indicó con el símbolo (X), mientras que la ausencia del mismo se indicó con el símbolo (-).

En la composición de propóleos de zonas templadas, como los analizados en este estudio, es frecuente encontrar ácido cumárico, ferúlico, gálico y cafeico, apigenina, pinobanksina, crisina, pinocembrina y galangina, entre otros fenoles (Huang *et al.*, 2014). Esto se ha relacionado con la presencia de álamos (*Populus sp.*) en las cercanías de los apiarios, dado que las abejas recolectan sus resinas con marcada preferencia para la elaboración de este producto, y las mismas se componen químicamente de los mencionados fenoles (Dezmirean *et al.*, 2021). También se suele determinar la presencia de quercetina y canferol en los propóleos, los cuales están presentes en los exudados de un gran número de especies vegetales. Cabe mencionar que, en las plantas, los mismos se encuentran en forma de glucósidos, siendo modificados en agliconas durante la elaboración del propóleos por la acción de enzimas glucosidasas de las abejas (Hossain *et al.*, 2022; Wieczorek *et al.*, 2022). Los registros sobre el origen botánico de los distintos componentes del propóleos son extensos, indicando que las abejas, a través de un proceso bioselector (Bedascarrasbure *et al.*, 2006), se valen de numerosas especies vegetales para la elaboración de este producto (Simone-Finstrom y Spivak, 2010; Chimshirova *et al.*, 2022). Esto favorece su diversidad y complejidad, tal como se observó en las muestras analizadas, incluso de regiones cercanas.

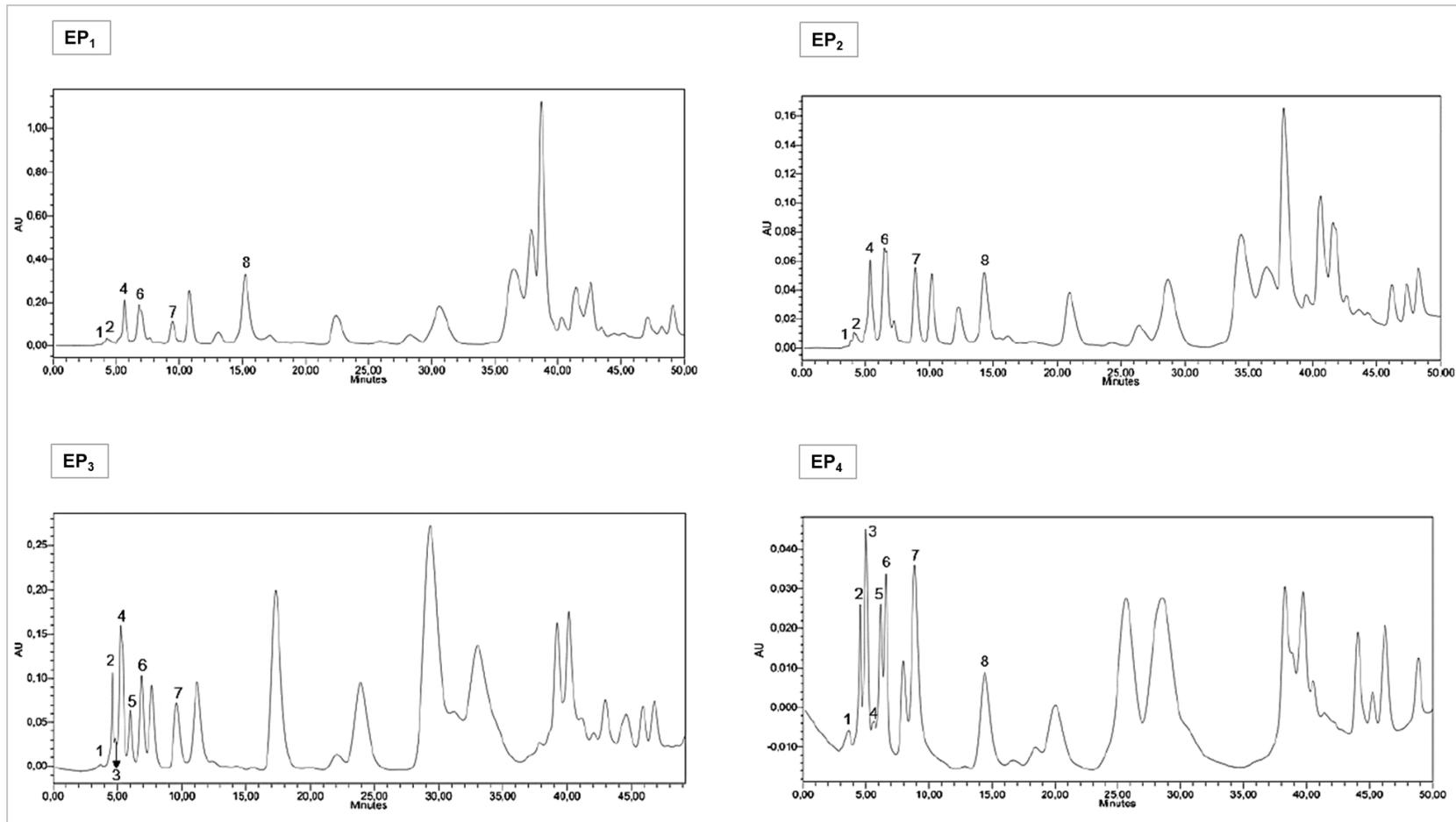


Figura 2-6. Perfil de polifenoles analizado por HPLC-DAD de extractos hidroalcohólicos de propóleos (EP), elaborados con muestras de distintas zonas de Argentina: Río Colorado, Pcia. de Río Negro (EP₁), Carmen de Patagones, Pcia. de Buenos Aires (EP₂), Bahía Blanca, Pcia. de Buenos Aires (EP₃), Luján de Cuyo, Pcia. de Mendoza (EP₄). Los números indicados en los picos responden a: (1) ácido cumárico; (2) ácido ferúlico; (3) ácido gálico; (4) ácido cafeico; (5) quercetina; (6) apigenina; (7) canferol; (8) galangina.

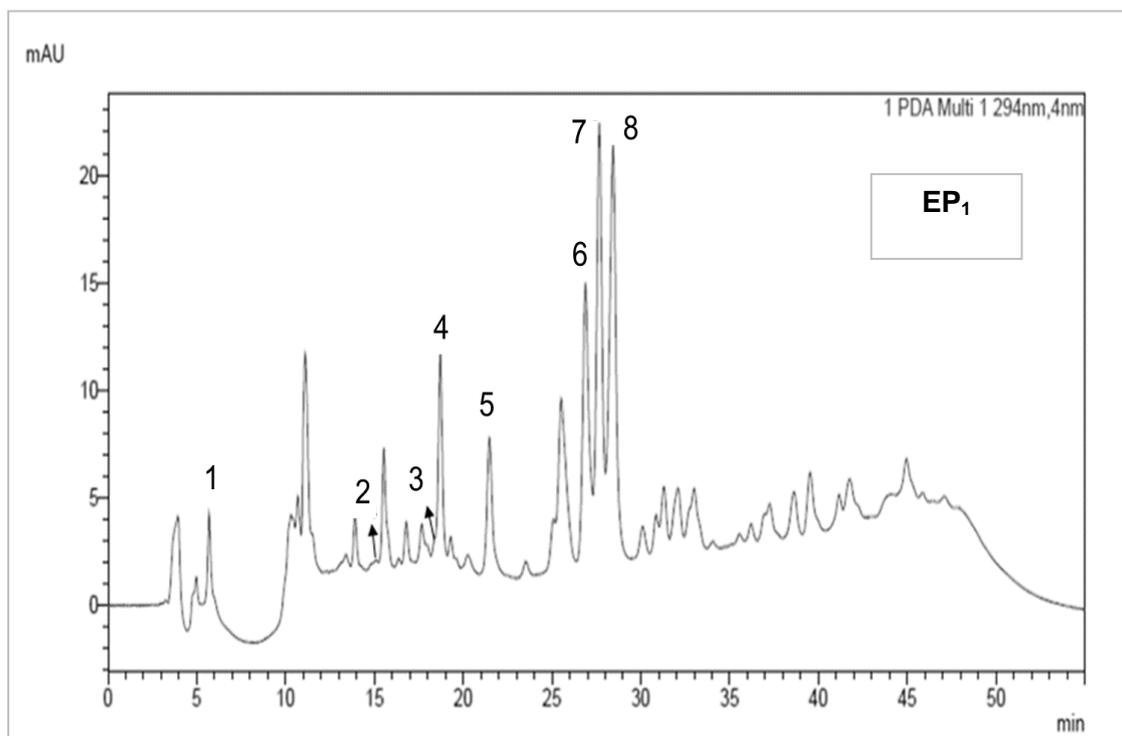


Figura 2-7. Estudio adicional del perfil de polifenoles del EP₁, elaborado con propóleos obtenido en Río Colorado, Pcia. de Río Negro, Argentina, analizado por HPLC-DAD. Los números indicados en los picos responden a: (1) ácido cafeico; (2) ácido cumárico; (3) ácido ferúlico; (4) quercetina; (6) 1,5,7-trihidroxi-flavanona; (7) apigenina; (8) pinobanksina; (9) crisina; (10) pinocembrina; (11) galangina.

2-3.2. Caracterización de aceites esenciales de orégano

La Tabla 2-6 y la Figura 2-8 muestran los resultados de la caracterización de los AEO. Todas las muestras presentaron un alto contenido de terpenos, sin embargo, se diferenciaron notablemente en sus perfiles químicos. Los componentes mayoritarios de AEO₁ fueron γ -terpineno, cis-p-ment-2-en-1-ol, terpinen-4-ol, timol y α -terpineno. En términos generales, esta muestra presentó un alto contenido de monoterpenos hidrocarbonados (46,6 %), además de monoterpenos oxigenados (36,15 %) y monoterpenos aromáticos (14,98 %). En AEO₂ se encontró una mayor proporción de timol, seguido de cis- β -terpineol, terpinen-4-ol, p-cimeno y carvacrol. Los compuestos de esta muestra se clasificaron como monoterpenos aromáticos (44,28 %), monoterpenos hidrocarbonados (12,07 %), monoterpenos oxigenados (28,12 %), sesquiterpenos hidrocarbonados (5,03 %) y sesquiterpenos oxigenados (10,48 %). Por último, AEO₃ mostró un mayor contenido de γ -terpineno, α -terpineno, β -pineno y terpinen-4-ol. En esta muestra se cuantificaron monoterpenos hidrocarbonados (84,11 %), monoterpenos oxigenados (8,12 %) y sesquiterpenos hidrocarbonados (7,77 %). Tomando como referencia la clasificación descrita por Arcila Lozano *et al.* (2004), los

AEO analizados se clasificaron como quimiotipos ricos en γ -terpineno (AEO₁ y AEO₃) y timol (AEO₂).

El AEO es un producto resultante del metabolismo secundario vegetal, por lo que su composición puede verse afectada por múltiples factores, tanto endógenos como exógenos, y en consecuencia variar significativamente (Barra, 2009; Hao *et al.*, 2022). Se ha reportado que muestras obtenidas de *Origanum vulgare* L. spp. *hirtum* (Link) letsvaart, presentan mayor contenido de compuestos volátiles que aquellas de *O. vulgare* L. spp. *vulgare* L. (Kokkini, 1996; De Martino *et al.*, 2009). Esto concuerda con los resultados de este estudio, ya que AEO₂ presentó mayor contenido de timol y carvacrol que las restantes. Por otro lado, se ha descrito que las condiciones climáticas imperantes durante el cultivo de orégano, así como las prácticas de manejo utilizadas, influyen notablemente en la composición del aceite esencial (Novak *et al.*, 2010; Mechergui *et al.*, 2016; De Mastro *et al.*, 2017). Esto contribuye a explicar, en gran parte, las diferencias encontradas en este estudio.

En relación a lo anterior, y de acuerdo a la bibliografía, la diferencia en la composición química de los AEO tiene su base en modificaciones que pueden sufrir las rutas metabólicas y enzimas involucradas en la síntesis del aceite esencial (Morshedloo *et al.*, 2018; Alekseeva *et al.*, 2020). Así, en las especies de la familia Lamiaceae, la síntesis de terpenos ocurre en las células secretoras de los tricomas glandulares. En ellas, a partir del pirofosfato de isopentenilo (IPP) y de su isómero el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), se forman el pirofosfato de geranilo (GPP) y el pirofosfato de farnesilo (FPP). GPP es precursor de monoterpenos, y a través de la ruta biosintética conocida como “cymyl pathway” se obtienen el γ -terpineno, p-cimeno, timol y carvacrol. Por su parte, FPP es precursor de sesquiterpenos (Lima *et al.*, 2013). El genotipo y las condiciones bajo las que crece y se desarrolla el cultivo, favorecerán ciertas rutas biosintéticas y enzimas por sobre otras, determinando la composición particular de cada muestra (Crocchi *et al.*, 2010). No obstante, al analizar las variaciones en la composición de este producto, también se deben considerar cuestiones posteriores al cultivo como, por ejemplo, la época de cosecha y forma de secado del material vegetal (Jerković *et al.*, 2001), el método utilizado para la obtención del aceite esencial y las condiciones de almacenamiento (Tibaldi *et al.*, 2011).

En Argentina, se ha descrito una amplia variedad de componentes que pueden encontrarse en los AEO (Leyva-López *et al.*, 2017). De acuerdo a Dambolena *et al.* (2010), las muestras de provenientes de este país presentan, en general, una baja concentración de carvacrol y son abundantes en γ -terpineno, debido al genotipo del material vegetal originalmente introducido y a las condiciones climáticas

imperantes en las zonas productoras de orégano, que tienden a ser frías. Respecto a esto último, Novak *et al.* (2010) postularon que las temperaturas cálidas favorecen la síntesis de carvacrol, y que, por el contrario, las bajas aumentan el contenido de timol. De todas formas, los AEO argentinos suelen contener un alto y variado porcentaje de compuestos bioactivos, tal como sucedió en este estudio, siendo de interés para numerosas aplicaciones (Grondona *et al.*, 2014; Asensio *et al.*, 2015).

Tabla 2-6. Composición química de aceites esenciales obtenidos a partir de hojas y tallos de distintas variedades de orégano (AEO), analizada por GC-MS. Las muestras corresponden a material vegetal proveniente de distintas zonas de Argentina: INTA Hilario Ascasubi, Pcia. de Buenos Aires (AEO₁), Azul, Pcia. de Buenos Aires (AEO₂) y Gral. Fernández Oro, Pcia. de Río Negro (AEO₃).

Pico N°	Nombre del compuesto ^a	Índice de retención ^b	Porcentaje		
			AEO ₁	AEO ₂	AEO ₃
1	α -tujeno	924	0,935	- ^c	1,775
2	α -pineno	932	0,777	0,740	1,660
3	sabineno	969	4,265	-	-
4	β -pineno	974	0,530	1,400	6,615
5	β -mirceno	988	1,128	-	-
6	α -felandreno	1002	0,371	-	-
7	α -terpineno	1014	6,251	0,650	12,440
8	o-cimeno	1021	-	-	3,073
9	p-cimeno	1022	2,501	4,450	3,710
10	D-limoneno	1024	1,806	4,200	-
11	trans- β -ocimeno	1050	-	-	4,071
12	γ -terpineno	1054	26,621	0,630	50,71
13	hidrato de cis-sabineno	1065	2,733	2,110	2,465
14	terpinoleno	1086	1,343	-	-
15	cis-p-ment-2-en-1-ol	1118	14,938	-	-
16	trans-p-ment-2-en-1-ol	1136	4,543	-	-
17	cis- β -terpineol	1140	0,919	13,780	-

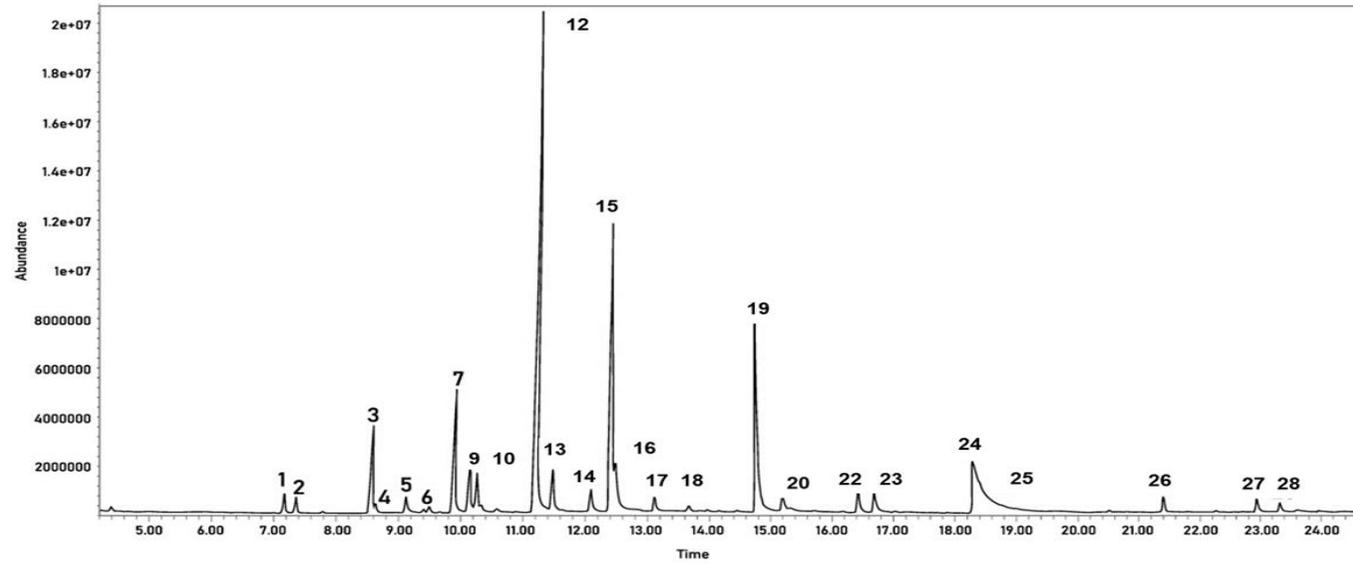
Pico N°	Nombre del compuesto ^a	Índice de retención ^b	Porcentaje		
			AEO ₁	AEO ₂	AEO ₃
18	trans-β-terpineol	1159	0,403	1,480	-
19	terpinen-4-ol	1174	11,795	6,130	5,653
20	α-terpineol	1186	0,767	2,990	-
21	trans-carveol	1231	-	1,640	-
22	timol metil éter	1232	1,485	0,850	-
23	isotimol metil éter	1244	1,528	3,670	-
24	timol	1289	11,176	35,430	-
25	carvacrol	1298	0,725	4,330	-
26	trans-cariofileno	1417	0,837	2,500	4,313
27	α-humuleno	1452	0,879	-	-
28	germacreno D	1484	0,577	1,190	2,139
29	α-curcumeno	1485	-	0,720	1,310
30	β-bisaboleno	1508	-	0,630	-
31	espatulenol	1579	-	3,170	-
32	óxido de cariofileno	1581	-	7,310	-

^a Los compuestos se enumeraron en orden de elución en columna HP-5.

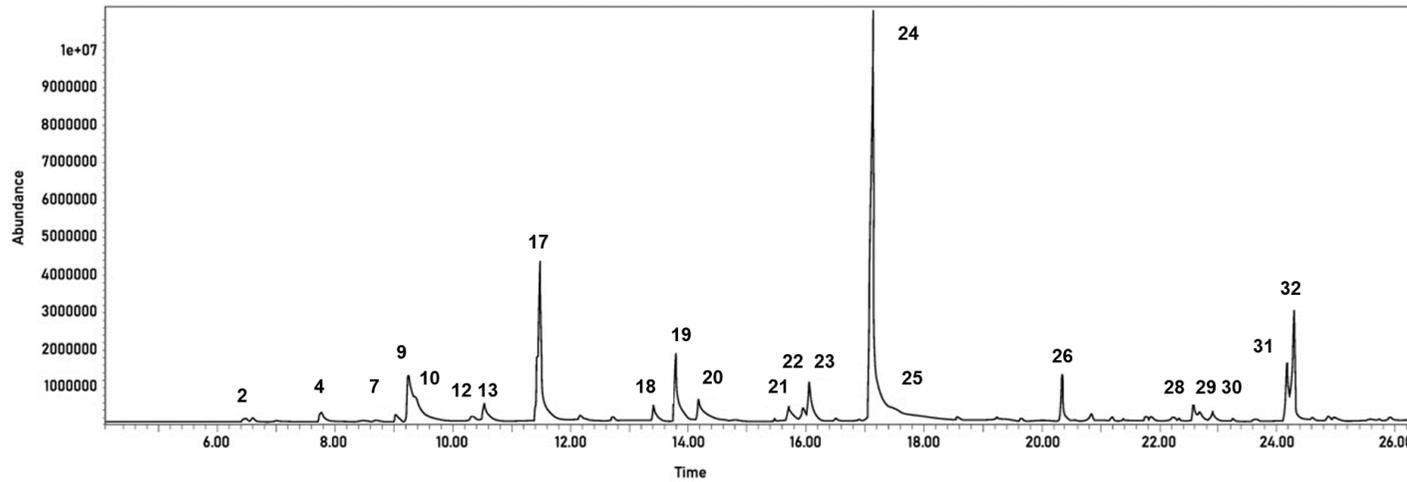
^b Índice de retención de Kovats (IK).

^c La ausencia del compuesto se indicó con el símbolo (-).

AEO₁



AEO₂



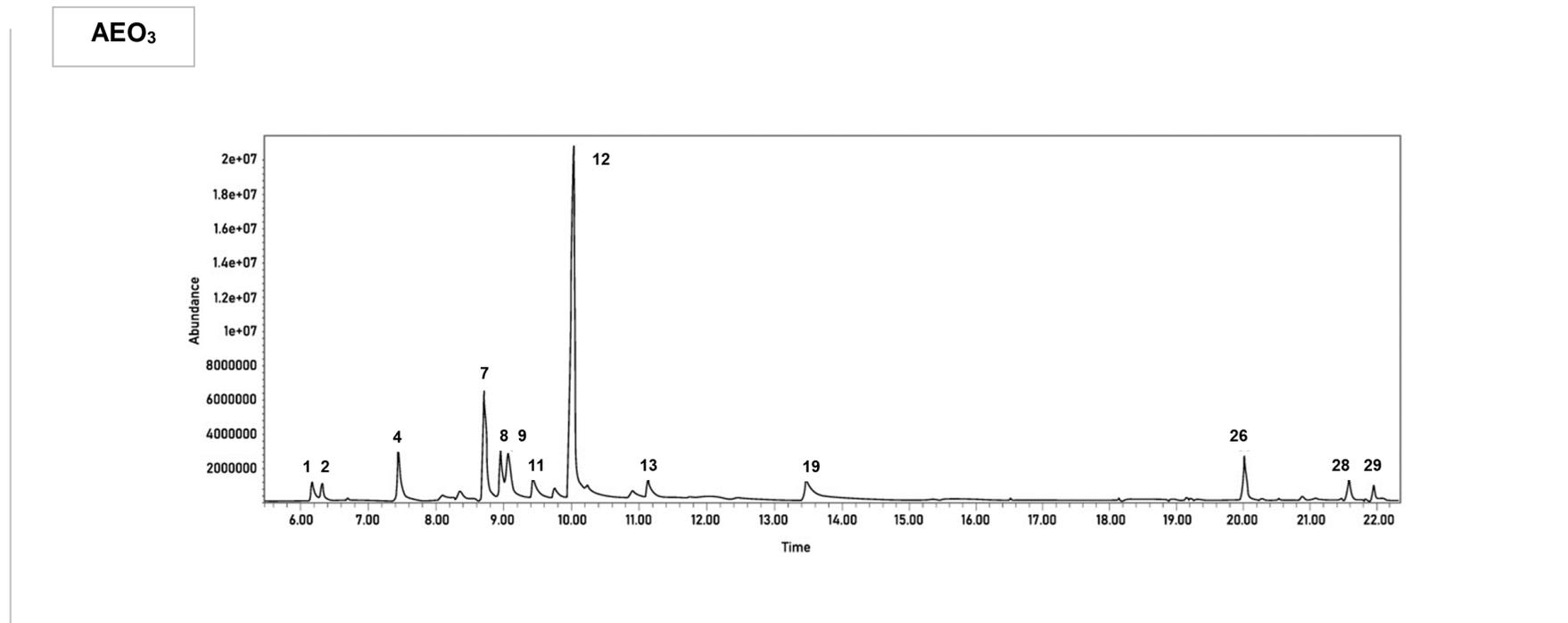


Figura 2-8. Cromatogramas de aceites esenciales de distintas variedades de orégano, analizados por GC-MS. Las muestras corresponden a material vegetal proveniente de distintas zonas de Argentina: INTA Hilario Ascasubi, Pcia. de Buenos Aires (AEO₁), Azul, Pcia. de Buenos Aires (AEO₂) y Gral. Fernández Oro, Pcia. de Río Negro (AEO₃). Los números en los picos se corresponden con la Tabla 2-6.

2-3.3. Caracterización de los PNB: consideraciones finales

La bibliografía referida a la caracterización de los PNB, menciona que la composición de estos varía debido a una sumatoria de factores que, en gran parte, resultan comunes a los propóleos y a los aceites esenciales. Esto incluye las fuentes vegetales de origen, la influencia del ambiente y de agentes bióticos, la acción del hombre al obtener, procesar y almacenar las muestras, entre otros (Bankova, 2005a; Barra, 2009).

La variabilidad en la composición del propóleos y del aceite esencial de orégano, así como la diversidad de compuestos presentes en cada uno de ellos, los hace valiosos como fuentes de nuevas moléculas bioactivas que tienen aplicaciones en diversos campos (Bankova, 2009), y también como agentes antimicrobianos que retardan el desarrollo de cepas patógenas resistentes (Rattan, 2010). Por tal motivo, caracterizar este tipo de productos es primordial para estandarizarlos y para comprobar la presencia de sustancias con acción biológica de interés. Sin embargo, lo anterior por sí solo, no constituye una medida directa de las propiedades bioactivas de los productos en cuestión, siendo necesario realizar estudios *in vitro* e *in vivo* con los organismos sobre los cuales se quiere probar su eficacia (Bankova y Marcucci, 2000).

Los estudios realizados para caracterizar propóleos en bruto, sus extractos (2-3.1.), y aceites esenciales de orégano (2-3.2.), dejó en evidencia, tal como indica la bibliografía, las diferencias existentes entre muestras de un mismo producto, y la abundancia en todas ellas de compuestos bioactivos resultantes del metabolismo secundario vegetal. Por tal motivo, ambos tipos de PNB se consideraron promisorios para el desarrollo de tratamientos antifúngicos destinados a la protección de semillas hortícolas.

Finalmente, cabe mencionar que, en los estudios realizados en esta tesis sobre las propiedades bioactivas del propóleos y del aceite esencial de orégano (Capítulos 4, 5 y 6), se utilizó el EP₁, ya que fue la muestra de la que mayor volumen se dispuso; con respecto a los AEO, estos se utilizaron de forma indistinta de acuerdo a su disponibilidad en cada ensayo.

2-4. Conclusiones

- Se observaron diferencias en las características sensoriales, físicas y químicas de los propóleos, y en los perfiles químicos de los aceites esenciales de orégano estudiados.
- Los extractos de propóleos y los aceites esenciales de orégano presentaron compuestos derivados del metabolismo secundario vegetal; en el primer caso estos

pertenecieron al grupo de los fenoles, mientras que en el segundo se encontraron mayoritariamente monoterpenos.

- Ambos productos naturales resultaron promisorios para realizar ensayos respecto de sus propiedades bioactivas.

- Conocer las características de estos productos, principalmente su composición química, resultó fundamental en el proceso de bioprospección, debido al gran número de factores que las determinan.

CAPÍTULO 3 – Caracterización de fitopatógenos de especies hortícolas

3-1. Introducción

Las enfermedades vegetales de origen fúngico y bacteriano causan importantes pérdidas productivas en la agricultura (Nazarov *et al.*, 2020). Dentro de los microorganismos responsables de estas, los hongos de los géneros *Penicillium* y *Sclerotinia* han sido ampliamente citados en la bibliografía por afectar a un gran número de cultivos (Adams y Ayers, 1979; Egbuta *et al.*, 2016; Leiva-Mora *et al.*, 2020). Por otro lado, las bacterias de los géneros *Clavibacter*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, han sido identificadas como agentes causales de diversas enfermedades vegetales (Agrios, 2005).

A nivel mundial, *Penicillium allii* es uno de los principales fitopatógenos que afecta a los bulbillos de ajo (*Allium sativum*). El ataque puede ocurrir durante el cultivo o en el almacenamiento, ocasionando diversos síntomas, principalmente podredumbres (Valdez *et al.*, 2006). Taxonómicamente pertenece a: Reino *Fungi*; División *Ascomycota*; Clase *Eurotiomycetes*; Orden *Eurotiales*; Género *Penicillium*; Subgénero *Penicillium*; Especie *Penicillium allii* (Vincent y Pitt, 1989; Houbraken *et al.*, 2020). Es parte del grupo de los Hongos Imperfectos (anteriormente Deuteromycetes), dado que se desconoce en ellos la fase reproductiva sexual (Kirk *et al.*, 2008). A nivel macromorfológico, las colonias son de crecimiento rápido, alcanzan un diámetro de entre 26 y 40 mm en 7 días, en medio de cultivo tipo agar Czapek (CYA), a 25 °C. Éstas poseen un tono verdoso dado por los conidios y producen exudados amarillentos o amarronados que difunden al medio. Micromorfológicamente, las colonias presentan hifas hialinas y septadas, forman conidios unicelulares, globosos, lisos y verdosos, en conidióforos hialinos, terverticilados, con forma de pincel (Dijksterhuis y Samson, 2007).

Por su parte, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary afecta un amplio rango de cultivos, especialmente del grupo de las dicotiledóneas (Purdy, 1979; Saharan y Mehta, 2008). En las semillas, plántulas y plantas de poroto (*Phaseolus* sp.), causa podredumbres que se caracterizan por la presencia de abundante micelio blanco algodonoso (Tu, 1988; Abán *et al.*, 2019; SINAVIMO, 2022). Taxonómicamente pertenece a: Reino *Fungi*; División *Ascomycota*; Clase *Discomycetes*; Orden *Helotiales*; Familia *Sclerotiniaceae*; Género *Sclerotinia*; Especie *Sclerotinia sclerotiorum*. A nivel morfológico, presenta hifas multinucleadas, hialinas y septadas. El micelio suele ser blanco con apariencia algodonosa, tanto en los medios de cultivo *in vitro*, como en las plantas afectadas. No presenta conidios asexuales. La supervivencia en el largo plazo es posible a través de esclerocios, que son estructuras

pigmentadas compuestas por un denso arreglo de hifas. Estos pueden germinar y producir micelio (germinación miceliogénica) o apotecios (germinación carpogénica), dependiendo de las condiciones ambientales. Los apotecios presentan forma de copa y contienen una lámina de ascos cerca de su superficie, con ascosporas que suelen ser la fuente de infección en la mayoría de las especies (Agrios, 2005; Bolton *et al.*, 2006).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm), *Pseudomonas corrugata*, *P. mediterranea*, *Xanthomonas gardneri* y *X. vesicatoria* son algunas de las principales bacterias fitopatógenas del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). Cmm causa la marchitez y decoloración de las hojas y pecíolos de las plantas, así como lesiones en los frutos, enfermedad conocida como “cancro bacteriano del tomate” (Méndez *et al.*, 2020). Se trata de una actinobacteria (filo *Actinobacteria*), pleomórfica, Gram-positiva, estrictamente aeróbica, no móvil y no esporulada (Gartemann *et al.*, 2003). Por otro lado, *P. corrugata* y *P. mediterranea* son dos proteobacterias (filo *Proteobacteria*), Gram-negativas, no esporuladas, que han sido identificadas como agentes causales de la necrosis de la médula del tomate (Catara *et al.*, 2002). En cuanto a *X. gardneri* y *X. vesicatoria*, éstas producen lesiones necróticas en todos los órganos aéreos de las plantas de tomate, razón por la cual se conoce a la enfermedad como “mancha bacteriana”. También son Gram-negativas y están clasificadas como proteobacterias (filo *Proteobacteria*) (Quezado-Duval *et al.*, 2004).

Con la finalidad de disponer de fitopatógenos que afectan especies de cultivos hortícolas, debidamente caracterizados para posteriormente realizar estudios *in vitro* e *in vivo* sobre las propiedades antimicrobianas de los PNB, los objetivos de este capítulo fueron:

- Aislar, caracterizar y conservar cepas de los hongos *P. allii* y *S. sclerotiorum*, y de las bacterias Cmm, *P. corrugata*, *P. mediterranea*, *X. gardneri* y *X. vesicatoria*;
- Probar la patogenicidad de las cepas aisladas sobre diseminulos de: ajo (*P. allii*), poroto pallares (*S. sclerotiorum*) y tomate (bacterias fitopatógenas).

3-2. Materiales y métodos

3-2.1. *Penicillium allii* fitopatógeno de ajo

a. *Aislamiento*: *P. allii* se aisló de bulbillos de ajo (*Allium sativum*) con signos y síntomas de la “mufa del ajo”, mediante la siembra directa de esporas en placas de Petri con medio de cultivo Agar Agua (AA, compuesto por 20 g de agar por litro de agua destilada). Las mismas se incubaron a 25 ± 2 °C durante siete días (Muñoz *et al.*,

2020). Posteriormente, se realizaron resiembras sucesivas en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD, compuesto por 200 g de papa, 20 g de agar y 20 g de dextrosa por litro de agua destilada), bajo las mismas condiciones de incubación iniciales, hasta obtener aislamientos monospóricos. La patogenicidad de este fitopatógeno se confirmó en ajo del tipo comercial colorado, siguiendo los postulados de Koch (Volcy, 2008).

b. Caracterización morfológica: se realizó mediante observaciones de colonias monospóricas cultivadas en medio CYA (25 ± 2 °C) (Visagie *et al.*, 2014; Houbraken *et al.*, 2020), utilizando un microscopio estereoscópico binocular Nikon SMZ 745T y un microscopio óptico (Axiostar Plus, Carl Zeiss).

c. Caracterización genotípica: la extracción de ADN genómico del hongo se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Visagie *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Brevemente, se colocó micelio de una colonia monospórica de aproximadamente cinco días en Eppendorfs de 1,5 mL de capacidad y se adicionaron 200 μ L de un buffer de lisis (100 μ L mL^{-1} de Tris HCL 200 Mm pH 7,5, 100 μ L mL^{-1} de NaCl 250 Mm, 100 μ L mL^{-1} de 0,5 % SDS y 100 μ L mL^{-1} EDTA 25 Mm con NaOH 10 %). Se mezcló con vórtex y se llevaron los tubos al freezer (-20 °C) durante 60 min. Se maceró el micelio con varilla de vidrio estéril, se agregaron otros 200 μ L de buffer de lisis y se colocaron los tubos en baño termostatzado a 65 °C durante 30 min. Luego de este choque térmico, se agregaron 300 μ L de NaCl 1 M por tubo, se homogeneizó manualmente y se centrifugaron los Eppendorfs a 10.000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos, a los cuales se les agregó etanol absoluto para provocar la precipitación del ADN. Se realizó una nueva centrifugación para descartar el alcohol, y se agregaron 200 μ L de etanol 70° por tubo para lavar los restos de sales. Se hizo una última centrifugación a 10.000 rpm durante 2 min para obtener finalmente el sobrenadante con el ADN que fue resuspendido en 150 μ l de buffer TE de pH 8 (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM.) y conservado a -20 °C hasta el momento de la amplificación.

La región ribosomal completa de los espacios de los intergenes ribosomales (ITS) de la subunidad 5.8S (ITS1-5.8SADNr-ITS2) y regiones parciales de las subunidades 18S y 28S parcial, se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores ITS1F (5'-CTGGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ L, con 1 U de Taq ADN polimerasa (PB-L, Argentina), buffer, 0,4 μ M de cada cebador, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,20mM de cada dNTP y 100 ng de ADN. Las

reacciones de amplificación se hicieron en un termociclador MyCycler (Bio-Rad, EE.UU.). Se utilizó el siguiente programa de PCR: amplificación a 94 °C durante 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C, por 30 s, unión de cebadores a 57 °C por 30 s y síntesis a 72 °C por 45 s, y extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR amplificados se secuenciaron bidireccionalmente utilizando el servicio comercial de Macrogen, Corea (<http://macrogen.com/>), y las secuencias obtenidas se usaron para consultar la herramienta Seqmatch del proyecto de base de datos Ribosomal II (Cole *et al.*, 2009).

d. Colección y obtención de colonias iniciales: el aislamiento de *P. allii* se conservó en tubos con APD, a una temperatura menor a 25 °C, en oscuridad, realizando resiembras periódicas cada seis meses. Para los ensayos realizados con este hongo (Capítulos 4 y 6), se utilizaron colonias monospóricas cultivadas en medio Hongos y Levaduras (HyL, Britania, Argentina), e incubadas a 25 ± 2 °C durante siete días (colonias iniciales). Oportunamente, se prepararon suspensiones de conidios en solución salina estéril (0,85 %), cuya concentración final se ajustó a 1 x 10⁵ esporas mL⁻¹ utilizando un hemocitómetro.

3-2.2. *Sclerotinia sclerotiorum* fitopatógeno de poroto pallares

a. Aislamiento: *S. sclerotiorum* se aisló de vainas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) con signos y síntomas de podredumbre blanca. Para esto, se sembraron esclerocios desinfectados en APD y se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante 14 días. Posteriormente se resembró el micelio obtenido bajo las mismas condiciones iniciales hasta obtener colonias puras (Wang *et al.*, 2008). La patogenicidad del aislamiento se comprobó sobre semillas de poroto pallares (*Phaseolus lunatus*), sembradas en bandejas que contenían sustrato estéril y micelio del hongo, adaptando los postulados de Koch (Volcy, 2008).

b. Caracterización morfológica y genotípica: este fitopatógeno se caracterizó morfológicamente de acuerdo a Le Tourneau (1979) y a Delhey *et al.* (2009), utilizando el mismo equipamiento que para *P. allii* (3-2.1.b.). Asimismo, se caracterizó genotípicamente siguiendo la metodología empleada en el estudio de *P. allii*, tanto para la extracción de ADN, como para su amplificación y secuenciación (3-2.1.c.).

c. Colección y obtención de colonias iniciales: la metodología para la conservación de *S. sclerotiorum* fue la misma que para *P. allii* (3-2.1.d.). En los

ensayos realizados con este hongo (Capítulos 4 y 6), se utilizaron colonias puras, sembradas en APD a partir del agregado de un disco de micelio (8 mm de diámetro), tomado con sacabocados del margen de una colonia en activo crecimiento. Estos cultivos se incubaron a 20 ± 2 °C durante cinco días (colonias iniciales).

3-2.3. Bacterias fitopatógenas del cultivo de tomate

Los estudios que se describen a continuación, se realizaron en el Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República del Uruguay, bajo la dirección de la Prof. y Dra. Elisa Silvera Pérez.

a. *Aislamiento*: las cinco especies bacterianas, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata*, *P. mediterranea*, *Xanthomonas gardneri* y *X. vesicatoria*, se aislaron de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) enfermas. La patogenicidad de todas las cepas se confirmó en tomate siguiendo los postulados de Koch.

b. *Caracterización morfológica y genotípica*: las bacterias se caracterizaron en base a la tinción de Gram y a las características morfológicas de sus colonias en los medios de cultivo agar nutritivo dextrosa (AND, compuesto por 5 g de triptona, 1 g de extracto de carne, 2 g de extracto de levadura, 5 g cloruro de sodio, 10 g glucosa y 12 g de agar bacteriológico por litro de agua destilada) y extracto de levadura dextrosa (YDC, NEOGEN, Argentina). *P. corrugata*, *P. mediterranea*, *X. gardneri* y *X. vesicatoria* se identificaron molecularmente mediante la secuenciación parcial del gen *gyrB*, utilizando los cebadores UP-1EF y APrUR (Yamamoto *et al.*, 2000). *Cmm* se caracterizó molecularmente con los cebadores CMM5F y CMM6R (Dreier *et al.*, 1995).

c. *Colección y obtención de colonias iniciales*: las bacterias se almacenaron en medio caldo nutritivo (CN, OXOID, UK) mezclado con glicerol (15% v/v), en ultracongelador (-20 ± 2 °C). Las colonias iniciales utilizadas en ensayos posteriores (Capítulo 4), se cultivaron en AND a 25 ± 2 °C durante 48 h. A partir de ellas se prepararon suspensiones de células bacterianas (1×10^8 u.f.c. mL⁻¹) en solución salina estéril (0,85 %).

3-3. Resultados y discusión

3-3.1. *Penicillium allii* fitopatógeno de ajo

El género *Penicillium* es ampliamente conocido, ya que su distribución es mundial y es frecuente encontrar sus especies en una gran diversidad de hábitats. Desde que se introdujo este nombre genérico, que significa “pincel”, se le han asociado más de mil especies, muchas de las que, según los criterios modernos, tienen sus descripciones incompletas o se consideran sinónimos de otras especies (Visagie *et al.*, 2014). En este contexto, los autores citados anteriormente proponen seguir una metodología de trabajo estándar para la correcta caracterización de las especies de *Penicillium*, lo que incluye descripciones morfológicas y análisis moleculares, tal como se realizó en este trabajo.

Las observaciones macroscópicas y microscópicas del fitopatógeno aislado (Figura 3-1), confirmaron que pertenecía al género *Penicillium*, especie *P. allii* (Visagie *et al.*, 2014; Houbraken *et al.*, 2020). Al respecto, se observó un crecimiento rápido de las colonias en medio CYA (25 ± 2 °C), ya que presentaron diámetros de aproximadamente 40 mm luego de 6 días de incubación. Cabe mencionar que la velocidad de crecimiento del hongo fue menor cuando las temperaturas durante su cultivo superaron los 30 °C. La coloración de las colonias fue verdosa en las áreas esporuladas y blanquecina en los márgenes de crecimiento (no esporulados). La textura se clasificó como granular. Se observaron surcos radiales principales y secundarios en las colonias, y se constató la presencia de exudados amarillentos difusivos al medio de cultivo, que en ciertas ocasiones también se encontraron en forma de gotas milimétricas sobre el hongo. A nivel microscópico se observaron conidióforos hialinos, terverticilados, con fiálides cilíndricas, y conidios globosos y verdosos, de aproximadamente 2,5 μm de diámetro. Todas estas características coincidieron con las reportadas por numerosos autores (Vincent y Pitt, 1989; Valdez *et al.*, 2006; Gálvez-Patón, 2017).

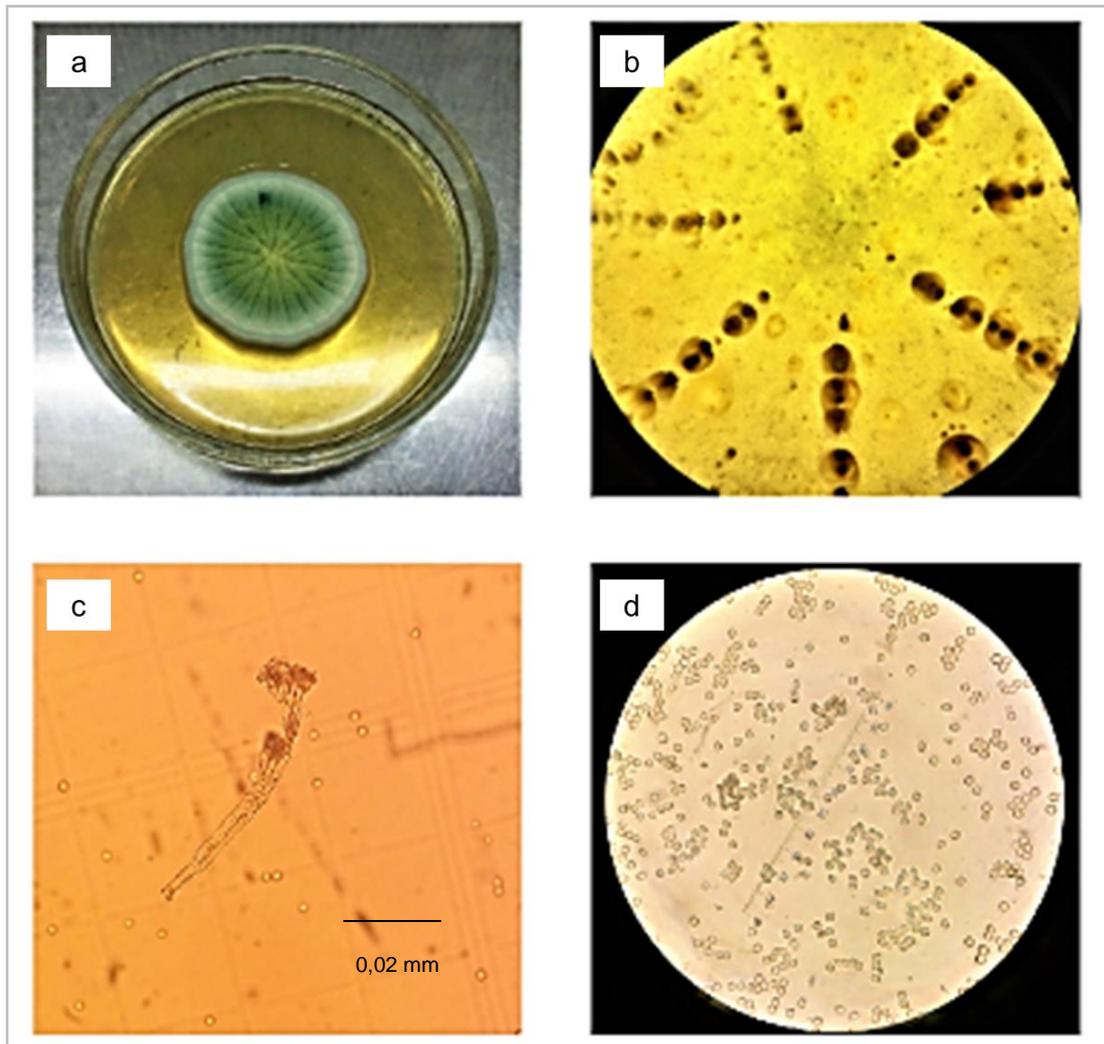


Figura 3-1. Características morfológicas de *Penicillium allii*: (a) colonia cultivada en CYA; (b) vista bajo microscopio estereoscópico de exudados amarillentos y surcos en una colonia; (c) conidióforo; (d) conidios sueltos.

En cuanto a la patogenicidad de la cepa en estudio, esta se comprobó sobre ajo colorado (*Allium sativum*): se observaron signos y síntomas de la “mufa del ajo” en los propágulos de ajo inoculados (Figura 3-2.a). Esto incluyó la podredumbre de los bulbillos, con presencia de moho verde-azulado, menor crecimiento y desarrollo de las plantas, y amarillamiento de sus hojas (Cavagnaro *et al.*, 2005). Asimismo, el reaislamiento y cultivo *in vitro* del fitopatógeno presentó las mismas características morfológicas del original. Los bulbillos sin inocular se mantuvieron sanos, y sus plantas tuvieron un crecimiento y desarrollo normal (Figura 3-2.b).

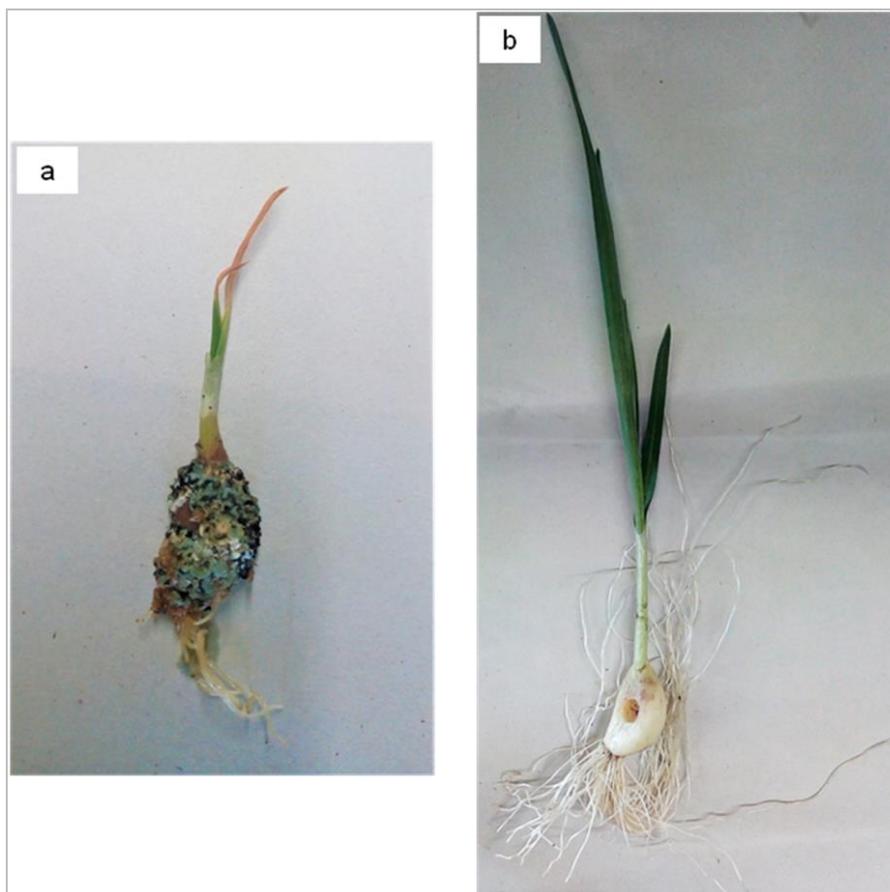


Figura 3-2. Ensayo de patogenicidad del aislamiento de *Penicillium allii* en bulbillos de ajo colorado, siguiendo los postulados de Koch: (a) bulbillito de ajo inoculado sobre una pequeña herida, con signos y síntomas de “mufa del ajo”; (b) planta de ajo sana, con una pequeña herida sin inocular.

La caracterización genotípica del fitopatógeno también demostró que el aislamiento pertenecía a la especie *Penicillium allii*, con una identidad del 99 %. La secuencia obtenida se ingresó con el número de acceso OP578409 en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

A partir de estos estudios, se obtuvo un aislamiento de *P. allii* fitopatógeno de ajo, que se coleccionó en el LabEA de la Universidad Nacional del Sur, Argentina.

3-3.2. *Sclerotinia sclerotiorum* fitopatógeno de poroto pallares

Existen en la bibliografía numerosos trabajos que documentan la diversidad de la población de *Sclerotinia sclerotiorum*, lo que incluye cepas fitopatógenas de poroto (Albán, 2019), girasol (Filippi, 2015) y papa (Chaudhary *et al.*, 2020), entre otros. Todos ellos han demostrado que es posible caracterizar a esta especie fitopatógena por métodos morfológicos y genéticos, como se realizó en este estudio.

Las observaciones macro y microscópicas de las colonias fúngicas (Figura 3-3) desarrolladas a partir de esclerocios tomados de vainas de porotos, demostraron que el fitopatógeno pertenecía al género *Sclerotinia*, especie *S. sclerotiorum*, tal como observaron otros autores (Le Tourneau, 1979; Wang *et al.*, 2008; Delhey *et al.*, 2009). Se observó un crecimiento rápido de las mismas, con un diámetro entre 50 y 70 mm en dos días. La velocidad de crecimiento de este hongo se vio significativamente disminuida cuando las temperaturas de incubación superaron los 30 °C. El micelio presentó color blanco y textura algodonosa. A partir de éste, se formaron numerosos esclerocios (alrededor de 20 por placa), observables a ojo desnudo (aproximadamente 5 mm de diámetro), oscuros, firmes y con formas variables, periféricos en su disposición. Asimismo, se visualizaron agregados densos de micelio, de los cuales exudaban gotas brillantes y plateadas, que en pocos días posteriores completaron su desarrollo en esclerocios. A nivel microscópico, las hifas se presentaron hialinas y septadas, sin formación de esporas. En los esclerocios se observó la corteza externa, constituida por paredes gruesas y melanizadas.

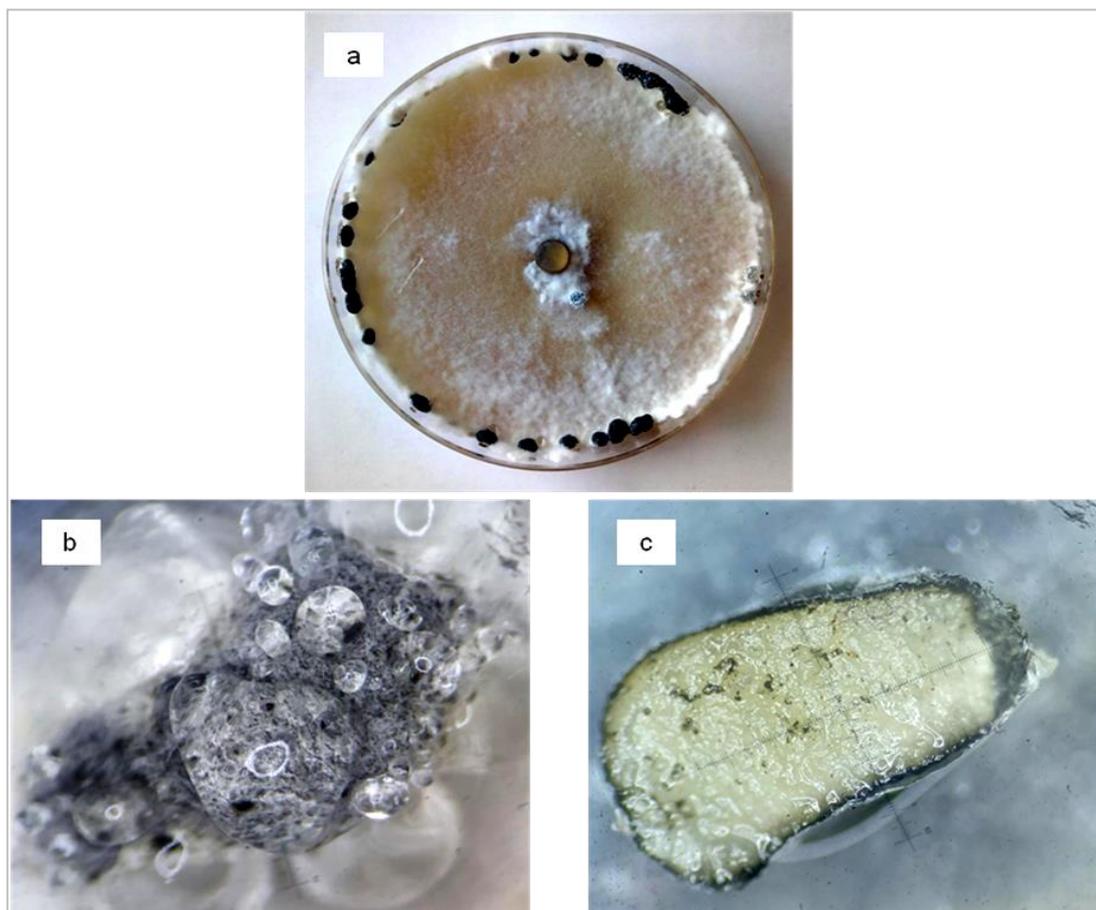


Figura 3-3. Características morfológicas de *S. sclerotiorum*: (a) colonia cultivada en APD a 25 ± 2 °C; (b) vista bajo microscopio estereoscópico de esclerocios en su etapa final de formación (micelio denso y aglomerado, con gotas brillantes); (c) corte de un esclerocio observado bajo microscopio estereoscópico.

Las semillas de poroto pallares sembradas en presencia de inóculo, presentaron signos y síntomas de “podredumbre blanca”, incluyendo la formación de un abundante micelio blanco algodonoso y la destrucción de sus tejidos (Figuras 3-4.a y b) (Abán, 2019). El reaislamiento y cultivo *in vitro* del micelio mostró las mismas características morfológicas que el original. En las bandejas sin incorporación de *S. sclerotiorum*, las semillas germinaron y las plántulas crecieron normalmente (Figura 3-4.c). De esta forma se demostró la patogenicidad de la cepa aislada sobre semillas de poroto pallares (*Phaseolus lunatus*).

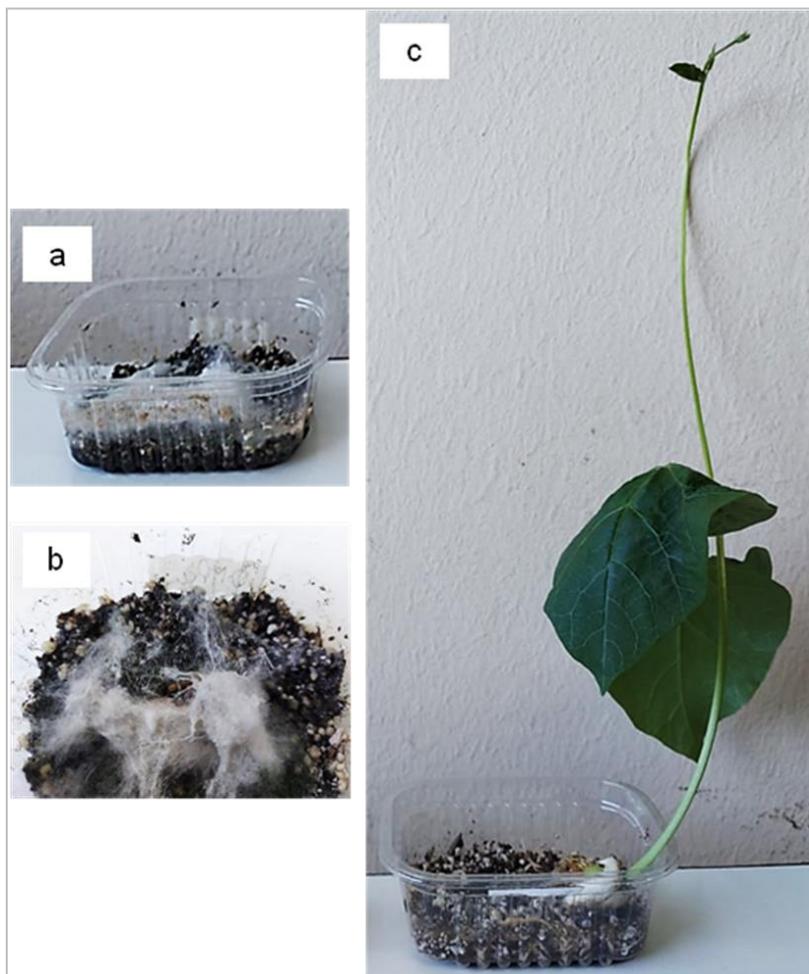


Figura 3-4. Estudio de la patogenicidad del aislamiento de *S. sclerotiorum* en poroto pallares: (a y b) semilla de poroto pallares cubierta por micelio blanco algodonoso, luego de ser cultivada en presencia del fitopatógeno; (c) plántula de poroto pallares sana, cultivada en sustrato estéril (sin presencia del fitopatógeno).

La caracterización genotípica confirmó que el hongo aislado pertenecía a la especie *Sclerotinia sclerotiorum*, con una identidad del 99 %. La secuencia de este nuevo aislamiento se ingresó con el número de acceso OP578410 en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

La cepa de *S. sclerotiorum* aislada y caracterizada se coleccionó en el LabEA, de la Universidad Nacional del Sur, Argentina.

3-3.3. Bacterias fitopatógenas del cultivo de tomate

Actualmente, la caracterización de las bacterias fitopatógenas se concentra en aspectos morfológicos, bioquímicos y, principalmente, en análisis moleculares. Estos últimos son clave para la taxonomía de las especies, ya que esta se actualiza constantemente debido a nuevas técnicas de secuenciación genómica (Vidaver y Lambrecht, 2004).

La coloración de Gram demostró que todas las bacterias eran Gram-negativas, a excepción del género *Clavibacter*. Por su parte, la caracterización morfológica demostró que todas las colonias presentaban las características culturales típicas de cada uno de los géneros en estudio (Figura 3-5).

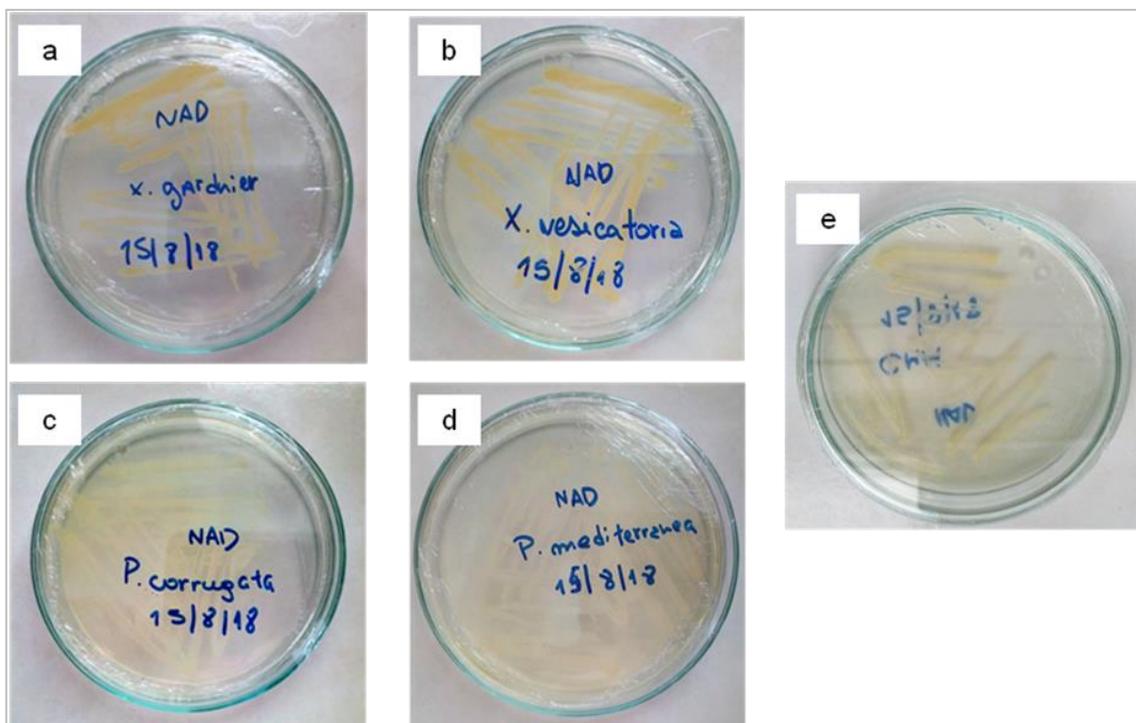


Figura 3-5. Bacterias fitopatógenas aisladas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*): (a) *Xanthomonas gardneri*; (b) *Xanthomonas vesicatoria*; (c) *Pseudomonas corrugata*; (d) *Pseudomonas mediterranea*; (e) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

La caracterización genotípica de las bacterias fitopatógenas que se utilizaron en los ensayos de esta tesis, permitió identificarlas como *Xanthomonas gardneri* (MT103547), *Xanthomonas vesicatoria* (MT103548), *Pseudomonas corrugata* (MT103549), *Pseudomonas mediterranea* (MT103550), y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (OP456082). Asimismo, se confirmó su patogenicidad sobre plantas de tomate siguiendo los postulados de Koch. Estas bacterias se coleccionaron en el Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República del Uruguay, Uruguay.

3-4. Conclusiones

- Se aislaron, caracterizaron y coleccionaron los hongos *Penicillium allii* y *Sclerotinia sclerotiorum*, y las bacterias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata*, *P. mediterranea*, *Xanthomonas gardneri* y *X. vesicatoria*.
- Se confirmó la patogenicidad de las cepas fúngicas y bacterianas sobre diseminulos de: ajo (*Penicillium allii*), poroto pallares (*Sclerotinia sclerotiorum*) y tomate (bacterias fitopatógenas).

CAPÍTULO 4 – Estudios *in vitro* de la actividad antimicrobiana del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre fitopatógenos

4-1. Introducción

En el proceso de desarrollo de biopesticidas, los productos naturales que poseen compuestos biológicamente activos son evaluados *in vitro* bajo condiciones de laboratorio para determinar su actividad antimicrobiana. Esto facilita su selección en las etapas iniciales de su estudio (Lengai y Muthomi, 2018).

En los últimos años, numerosos investigadores han probado, bajo condiciones de laboratorio, el efecto antifúngico y antibacteriano del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre diversos fitopatógenos (Tapwal *et al.*, 2011; Jiménez-Reyes *et al.*, 2019). Los resultados son alentadores, sin embargo, realizar comparaciones entre éstos suele ser dificultoso, debido a diferencias en los procedimientos experimentales. Por tal motivo, el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI), organización sin fines de lucro y reconocida a nivel mundial, ha estandarizado técnicas para el estudio de la susceptibilidad microbiana a diversos agentes. Estas pruebas son conocidas como antibiogramas o AST, por las siglas en inglés de “Antimicrobial Susceptibility Testing” (Fothergill, 2012).

En los antibiogramas se enfrentan agentes patógenos a sustancias que se aplican al medio de cultivo en determinadas concentraciones (Akualing y Rejeki, 2018). Dentro de las técnicas clásicas, se conocen la bioautografía por cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC), la prueba de gradiente antimicrobiano o epsilometría (E-test), las pruebas de difusión o cualitativas, que incluyen la difusión por discos, difusión por pozo en agar y el envenenamiento del medio de cultivo, y, finalmente, los métodos de dilución o cuantitativos, como, por ejemplo, la dilución en agar y la dilución en caldo (Balouiri *et al.*, 2016).

Las técnicas de susceptibilidad antimicrobiana, por lo tanto, se presentan como procedimientos adecuados para probar inicialmente la eficacia del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano, sobre fitopatógenos de especies hortícolas. En consecuencia, se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar *in vitro* las propiedades antifúngicas del EP y del AEO, tanto de forma individual como en combinación, frente a *Penicillium allii* y *Sclerotinia sclerotiorum*;
- Determinar la acción antibacteriana *in vitro* del EP sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Pseudomonas corrugata*, *P. mediterranea*, *Xanthomonas gardneri* y *X. vesicatoria*.

4-2. Materiales y métodos

Se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana adaptando distintas técnicas propuestas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, tales como la dilución en agar (Gallez *et al.*, 2014), la difusión por discos (Sawaya *et al.*, 2002) y la macrodilución en caldo (Khosravi *et al.*, 2011).

Los PNB y los fitopatógenos utilizados en estos ensayos, fueron caracterizados en los Capítulos 2 y 3, respectivamente. En el estudio de la actividad antifúngica se probaron: EP₁ (origen Río Colorado) y AEO₁ (origen INTA Hilario Ascasubi), frente a *P. allii*; EP₁ y AEO₂ (origen Azul), frente a *S. sclerotiorum*. En el estudio sobre la actividad antibacteriana, se utilizó EP₁.

4-2.1. Actividad antifúngica *in vitro* del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre *Penicillium allii*

4-2.1.1. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana individuales

a. *Dilución en agar*: se evaluó el efecto del EP y del AEO sobre el crecimiento micelial de *P. allii*. Para esto, se prepararon distintas formulaciones en tubos Eppendorf estériles que consistieron en los PNB puros (EP¹ y AEO¹), tres diluciones dobles de cada uno de ellos (EP², EP³, EP⁴, AEO², AEO³, AEO⁴) y el fungicida comercial sintético Carbendazim (F, SC 50%, Gleba, Argentina, a razón de 2 mL L⁻¹). Las diluciones del EP se realizaron en agua destilada estéril (ADE), mientras que las diluciones del AEO se realizaron en ADE y Tween 20 (Biopack, Argentina) al 50 % (v/v). Además, se dispuso de un control positivo sin agregados (C+) y de dos controles metodológicos, hidroalcohol (HA, extractante del P) y Tween 20 (TW, tensioactivo utilizado para emulsionar el AEO a la dilución). En el ensayo, 100 µL de cada formulado fueron homogeneizados en placas de Petri (90 mm de diámetro), con 20 mL de HyL (a 40 °C). Una vez solidificado el agar, se colocó sobre la superficie de cada placa un disco de micelio (6 mm de diámetro), tomado con sacabocado estéril del borde de crecimiento de una colonia inicial. El ensayo se incubó en la oscuridad durante 9 días a 25 ± 2 °C. Diariamente se midió el diámetro del micelio de cada tratamiento y al finalizar se calculó el porcentaje de inhibición (I %) como:

$$I \% = 1 - \frac{(D_c - D_t)}{D_c} \times 100$$

donde D_c es el diámetro de la colonia del C+ y D_t es el diámetro de la colonia del tratamiento. Se siguió un diseño experimental completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento. El ensayo se repitió dos veces.

b. Difusión por discos: se evaluó el efecto de las mismas formulaciones y controles utilizados en la técnica de dilución en agar (4-2.1.1.a.), excepto por el fungicida sintético, sobre la germinación de conidios. Las condiciones de cultivo se repitieron, y el ensayo se incubó durante nueve días. El procedimiento consistió en incorporar 100 μ L de suspensión de conidios sobre la superficie del agar de placas de Petri. Luego, se colocaron equidistantemente cuatro discos de papel filtro (6 mm de diámetro) por placa. Los discos se impregnaron con 10 μ L de la formulación correspondiente. Las zonas de inhibición alrededor de los discos se midieron en milímetros cada 72 h. El porcentaje de inhibición (I %) se calculó como:

$$I \% = 1 - \frac{(D_m - D_t)}{D_m} \times 100$$

donde D_m es el diámetro del mayor halo de inhibición y D_t es el diámetro del halo de inhibición del tratamiento. Se siguió un diseño experimental completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento. El ensayo se repitió dos veces.

c. Bioactividad de compuestos volátiles: la contribución de los compuestos volátiles (o fase volátil) al efecto antifúngico del EP y del AEO, se evaluó utilizando tres tipos de dispositivos (Figura 4-1): placas de Petri con un disco de papel filtro pegado en el centro de tapa superior (prueba de volátiles); placas de Petri con un disco de papel filtro ubicado sobre el centro del agar, cubierto con una pequeña campana de plástico de 2 cm de diámetro (prueba de limitación de volátiles) (Figura 4-2); y placas de Petri con un disco de papel filtro ubicado en el centro del agar (prueba de difusión) (Inouye *et al.*, 2006). En cada dispositivo se colocaron 20 mL de HyL y se sembraron sobre la superficie del agar 100 μ L de suspensión de esporas. Los tratamientos consistieron en impregnar los discos de papel filtro (6 mm de diámetro) de cada dispositivo, con 10 μ L de EP, AEO, ADE (C+) o hidroalcohol (HA). Las placas de Petri se sellaron con Parafilm e incubaron por nueve días a 25 ± 2 °C en la oscuridad. Finalizado el ensayo, se midió (en milímetros) el diámetro de la zona de inhibición de cada dispositivo.

Las proporciones de la actividad de vapor y de difusión se estimaron de acuerdo al índice δ propuesto por Inouye *et al.* (2006). El ensayo se repitió tres veces.

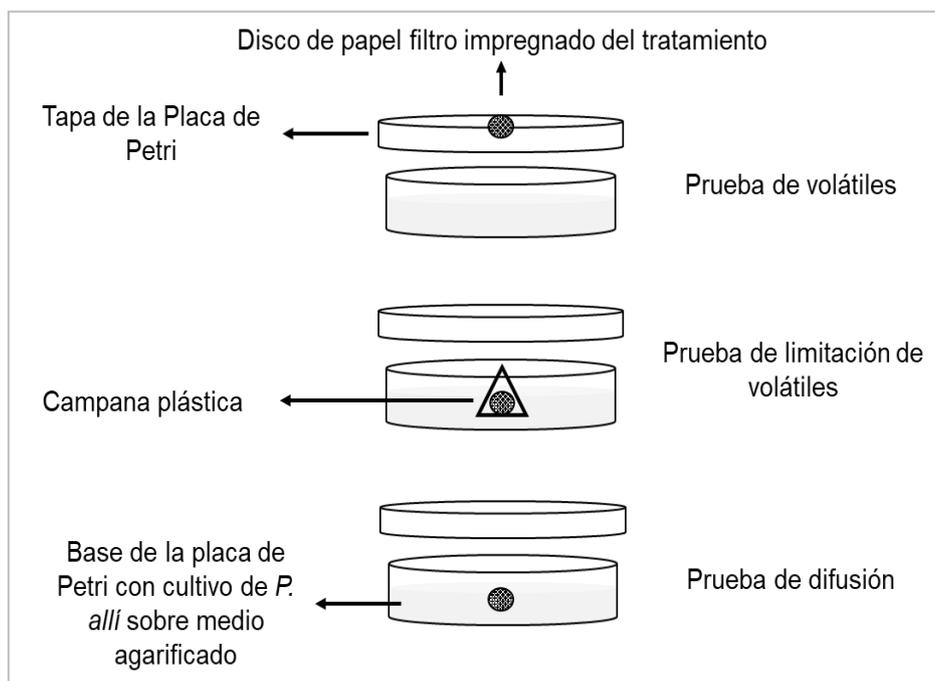


Figura 4-1. Esquema de los dispositivos utilizados para evaluar la bioactividad de los compuestos volátiles del EP y del AEO (vista lateral de las cajas de Petri).

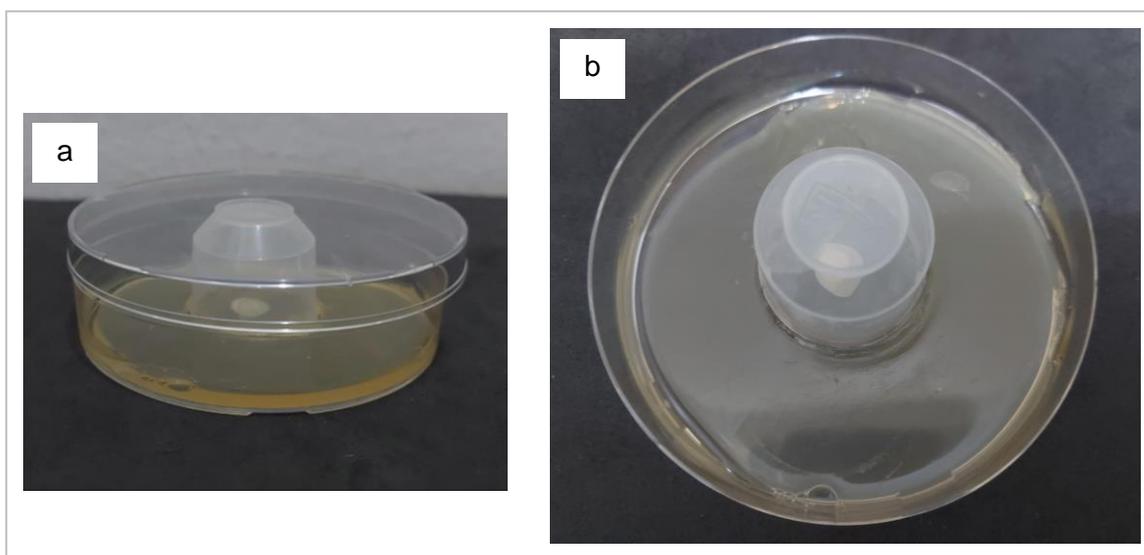


Figura 4-2. Prueba de limitación de volátiles: vista (a) lateral y (b) superior de una placa de Petri al inicio del ensayo; se observa un disco de papel filtro ubicado sobre el centro del agar, cubierto con una campana de plástico.

d. *Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) y de la concentración fungicida máxima (CFM):* la CIM y la CFM del EP y del AEO se determinaron por macrodilución en caldo, utilizando ocho diluciones aritméticas de cada producto. Las concentraciones del EP estuvieron en el rango del 5,0 % al 0,036 %

(v/v) y las del AEO del 1,25 % y el 0,009 % (v/v). Se incluyó un control positivo sin agregados (C+), un control estéril (C-) y un control metodológico con hidroalcohol al 5 % (HA). Este ensayo se realizó en erlenmeyers de 25 mL de capacidad, con 20 mL de caldo tipo HyL (compuesto por 5 g de extracto de levadura, 20 g de glucosa y 0,1 g de cloranfenicol por litro de agua destilada), en los que se incorporaron 100 µL de suspensión de esporas, seguidamente de los PNB. Posteriormente, los matraces fueron tapados con un tapón microbiológico estéril, e incubados a 25 ± 2 °C en un agitador orbital (80 rpm) durante cinco días.

Inicialmente se registraron los tratamientos con o sin desarrollo fúngico visible. Luego, en los primeros, se determinó el peso seco de la biomasa fúngica, mientras que en los segundos se sembraron 10 µL del medio de incubación en APD. Transcurridos siete días desde la resiembra, se realizó el conteo de los conidios germinados. La CIM se definió como la concentración más baja del EP y del AEO que inhibió completamente el crecimiento visible del hongo en el medio de cultivo líquido. La CFM se determinó como la concentración más baja del EP y del AEO que provocó la muerte del inóculo, después del subcultivo. Este ensayo se realizó tres veces.

4-2.1.2. Prueba de sinergismo antifúngico

Se determinó la interacción antifúngica entre el EP y el AEO siguiendo una matriz del tipo tablero de ajedrez ("Checkerboard Method") (Orhan *et al.*, 2005). Las concentraciones evaluadas fueron la CIM y 1/2, 1/4 y 1/8 de sus valores, para cada producto. Las diluciones del EP se dispusieron horizontalmente y las del AEO verticalmente. Se incluyeron un control positivo sin agregados (C+) y un control estéril (C-). Los procedimientos y condiciones del ensayo fueron los mismos que para las determinaciones de la CIM y CFM (4-2.1.1.d).

Para evaluar la interacción entre ambos PNB, se calculó el índice de la concentración inhibitoria fraccional (ICIF) como:

$$ICIF = CIF_{EP1} + CIF_{AEO1}$$

donde CIF es la concentración inhibidora fraccional de cada producto, calculada como el cociente entre la CIM en la combinación y la CIM del producto individual. Los resultados fueron considerados como sinergia ($ICIF < 0,5$), adición ($0,5 \leq ICIF \leq 1$), indiferencia ($1 < ICIF \leq 4$) y antagonismo ($ICIF > 4$). Este ensayo se llevó a cabo tres veces.

4-2.1.3. Análisis estadístico de los datos

Se realizó el ANAVA de los resultados de los ensayos 4-2.1.1.a. (dilución en agar), 4-2.1.1.b. (difusión por discos) y 4-2.1.1.d (desarrollo de biomasa fúngica en la determinación de la CIM y CFM). Cuando se detectaron valores significativos de F, las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ($p < 0,05$). La fuerza de asociación entre los porcentajes de inhibición (I %) de los métodos de dilución en agar y de difusión por discos, fueron analizadas con el coeficiente de correlación de Spearman.

Se utilizó el software Infostat para los mencionados análisis (Di Rienzo *et al.*, 2010).

4-2.2. Actividad antifúngica *in vitro* del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

4-2.2.1. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana individuales

a. *Dilución en agar*: se evaluó el efecto de cuatro concentraciones del EP y del AEO sobre el crecimiento micelial, utilizando una metodología similar y las mismas formulaciones que para *P. allii* (4-2.1.1.a.), excepto por el control metodológico de TW ya que en pruebas preliminares se determinó que su efecto sobre el crecimiento del hongo fue nulo. El procedimiento consistió en agregar un disco de micelio (8 mm de diámetro) sobre la superficie del APD de cada placa de Petri. Las mismas fueron incubadas en la oscuridad a 25 ± 2 °C durante 48 h, momento en el cual el C+ cubrió la superficie de la placa. Posteriormente se midió el crecimiento de las colonias, se calculó I % y se realizaron observaciones respecto del número y desarrollo de esclerocios en cada tratamiento. Se siguió un diseño experimental completamente aleatorizado, con cuatro repeticiones por tratamiento. El ensayo se repitió dos veces.

b. *Bioactividad de compuestos volátiles*: la contribución de los compuestos volátiles en el efecto antifúngico del EP y del AEO, se evaluó utilizando dispositivos y tratamientos equivalentes a los dispuestos para *P. allii* (4-2.1.1.c.). En este ensayo se incorporó un disco de micelio (6 mm de diámetro), tomado de colonias iniciales, a la superficie del APD de cada placa de Petri. En todos los dispositivos, los discos de micelio se distanciaron 1,5 cm del centro de los discos de papel filtro que contenían los tratamientos. La zona de inhibición se midió (en milímetros) luego de nueve días de incubación, haciendo una valoración completa del formato adoptado por cada colonia

en el recipiente. Las proporciones de la actividad de vapor y de difusión se estimaron según el índice δ propuesto por Inouye *et al.* (2006). El ensayo se realizó tres veces.

c. Determinación de la CIM y de la CFM: se utilizó la técnica de macrodilución en caldo, siguiendo el mismo procedimiento estándar que para *P. allii* (4-2.1.1.d.). Se ensayaron siete diluciones aritméticas de cada producto. Las concentraciones del EP estuvieron en el rango del 4,0 % al 0,06 % (v/v), mientras que las del AEO entre 1,25 % y el 0,01 % (v/v). Se incluyó un control positivo sin agregados (C+), un control estéril (C-) y un control metodológico con hidroalcohol al 5 % (HA). Este ensayo se realizó en erlenmeyers de 25 mL de capacidad, con 20 mL de caldo tipo HyL, habiéndose incorporado en cada uno un disco de micelio de 5 mm de diámetro tomado de una colonia inicial. El ensayo se incubó a 25 ± 2 °C en un agitador orbital (80 rpm) durante cinco días. La evaluación de los resultados se realizó de la misma forma que para *P. allii*. Este ensayo se realizó tres veces.

4-2.2.2. Prueba de sinergismo antifúngico

Se determinó la interacción antifúngica entre el EP y el AEO siguiendo una matriz del tipo tablero de ajedrez, al igual que para *P. allii* (4-2.1.2.). Las concentraciones evaluadas de cada producto incluyeron la CIM y 1/2, 1/4 y 1/8 de sus valores, junto a un control positivo sin agregados (C+) y un control estéril (C-). Los procedimientos y condiciones del ensayo fueron los mismos que en las determinaciones de MIC y MFC (4-2.2.1.c.). Para evaluar la interacción entre ambos PNB se calculó el ICIF a partir de la CIF de cada producto. Los criterios para clasificar el tipo de interacción fueron los mismos que para *P. allii* (4-2.1.2.). Este ensayo se llevó a cabo tres veces.

4-2.2.3. Análisis estadístico de los datos

Se realizó el ANAVA de los resultados del ensayo 4-2.2.1.a. (dilución en agar). Cuando se detectaron valores significativos de F, las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ($p < 0,05$).

Se utilizó el software Infostat para los análisis estadísticos (Di Rienzo *et al.*, 2010).

4-2.3. Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de propóleos sobre bacterias fitopatógenas del tomate

4-2.3.1. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Se utilizó la técnica de difusión por pozo en agar y se probaron cuatro formulaciones de EP, que consistieron en el EP puro (EP¹) y tres diluciones dobles del mismo, hechas en ADE (EP², EP³, EP⁴). También se incluyeron un control positivo sin agregados (C+) y un control metodológico con hidroalcohol (HA). El ensayo consistió en mezclar 18 mL de AND y 2 mL de suspensión bacteriana en placas de Petri. Una vez solidificado el agar, se hicieron seis pozos equidistantes (6 mm de diámetro) por placa, que se llenaron aleatoriamente con 10 µL del formulado correspondiente. El ensayo se incubó en la oscuridad a 25 ± 2 °C. A las 24, 48 y 72 h de incubación se midió el diámetro (mm) de los halos en las zonas de inhibición alrededor de los pozos.

4-2.3.2. Diseño y análisis estadístico de los datos

El diseño experimental fue en bloques simples, completos y aleatorizados, considerando como bloque a cada placa de Petri, con cinco repeticiones por bloque. El ensayo se repitió dos veces y se realizó el ANAVA de los resultados. Cuando se detectaron valores significativos de F, las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ($p < 0,05$). Se utilizó el software Infostat para los mencionados análisis (Di Rienzo *et al.*, 2010).

4-3. Resultados y discusión

4-3.1. Actividad antifúngica *in vitro* del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre *Penicillium allii*

En el ensayo de dilución en agar, el EP y el AEO inhibieron el crecimiento micelial de este fitopatógeno, resultando el segundo más eficaz que el primero y observándose una relación de dosis-respuesta en ambos casos (Tabla 4-1 y Figura 4-3). La bioactividad de los PNB disminuyó gradualmente a lo largo del tiempo, excepto por AEO¹, que logró detener totalmente el crecimiento del hongo durante 30 días. Por otra parte, F se diferenció estadísticamente de los tratamientos a base de EP y de AEO por presentar menor actividad antifúngica ($p < 0,05$). En este ensayo, al igual que en los restantes, los controles (C+, HA, TW) no mostraron efecto inhibitorio sobre *P. allii*, habiendo desarrollado colonias de aspecto conservado.

Tabla 4-1. Actividad antifúngica de distintas concentraciones de EP y de AEO sobre *P. allii*, evaluadas a través de las pruebas de dilución en agar [porcentaje de inhibición (I %)] y de difusión por discos [diámetro promedio del halo de inhibición (mm)]. Se incluyó un control positivo sin agregados (C+). Las concentraciones de cada producto se ordenaron de forma decreciente, siendo las más altas EP¹ y AEO¹.

Tratamiento	Dilución en agar			Difusión por discos		
	I %			Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	72 h (3 días)	144 h (6 días)	216 h (9 días)	72 h (3 días)	144 h (6 días)	216 h (9 días)
EP ¹	71,77 ± 0,97 a ^a	62,25 ± 1,26 a	56,91 ± 0,89 a	16 ± 0,92 ab	13,67 ± 0,56 a	13,50 ± 0,62 a
EP ²	59,12 ± 1,69 b	52,69 ± 1,43 b	43,43 ± 3,09 b	13,83 ± 0,41 b	13,75 ± 0,30 a	13,75 ± 0,30 a
EP ³	37,72 ± 0,97 c	31,66 ± 1,26 c	27,94 ± 2,43 c	10,08 ± 0,69 c	8,92 ± 0,31 b	8,75 ± 0,43 b
EP ⁴	30,90 ± 0,97 d	22,10 ± 0,95 d	18,85 ± 0,89 d	9,58 ± 0,68 c	8,92 ± 0,31 b	8,58 ± 0,51 b
AEO ¹	100 ± 0 e	100 ± 0 e	100 ± 0 e	43 ± 0 d	38 ± 1,07 c	38 ± 1,07 c
AEO ²	100 ± 0 e	100 ± 0 e	96,97 ± 2,10 f	19,08 ± 2,18 a	15,58 ± 1,24 a	14,67 ± 1,14 a
AEO ³	95,13 ± 2,58 f	74,19 ± 3,31 f	68,69 ± 3,25 g	13,92 ± 1,11 b	13,75 ± 1,14 a	13 ± 0,88 a
AEO ⁴	60,09 ± 1,95 b	49,34 ± 0,95 b	42,42 ± 0,58 b	10 ± 0,78 c	9,33 ± 0,40 b	2,50 ± 1,10 d
C+	0 ± 0 h	0 ± 0 h	0 ± 0 i	0 ± 0 e	0 ± 0 d	0 ± 0 e

^a Cada dato es el promedio de tres repeticiones ± desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna (tiempo de incubación), indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) según la prueba LSD de Fisher.

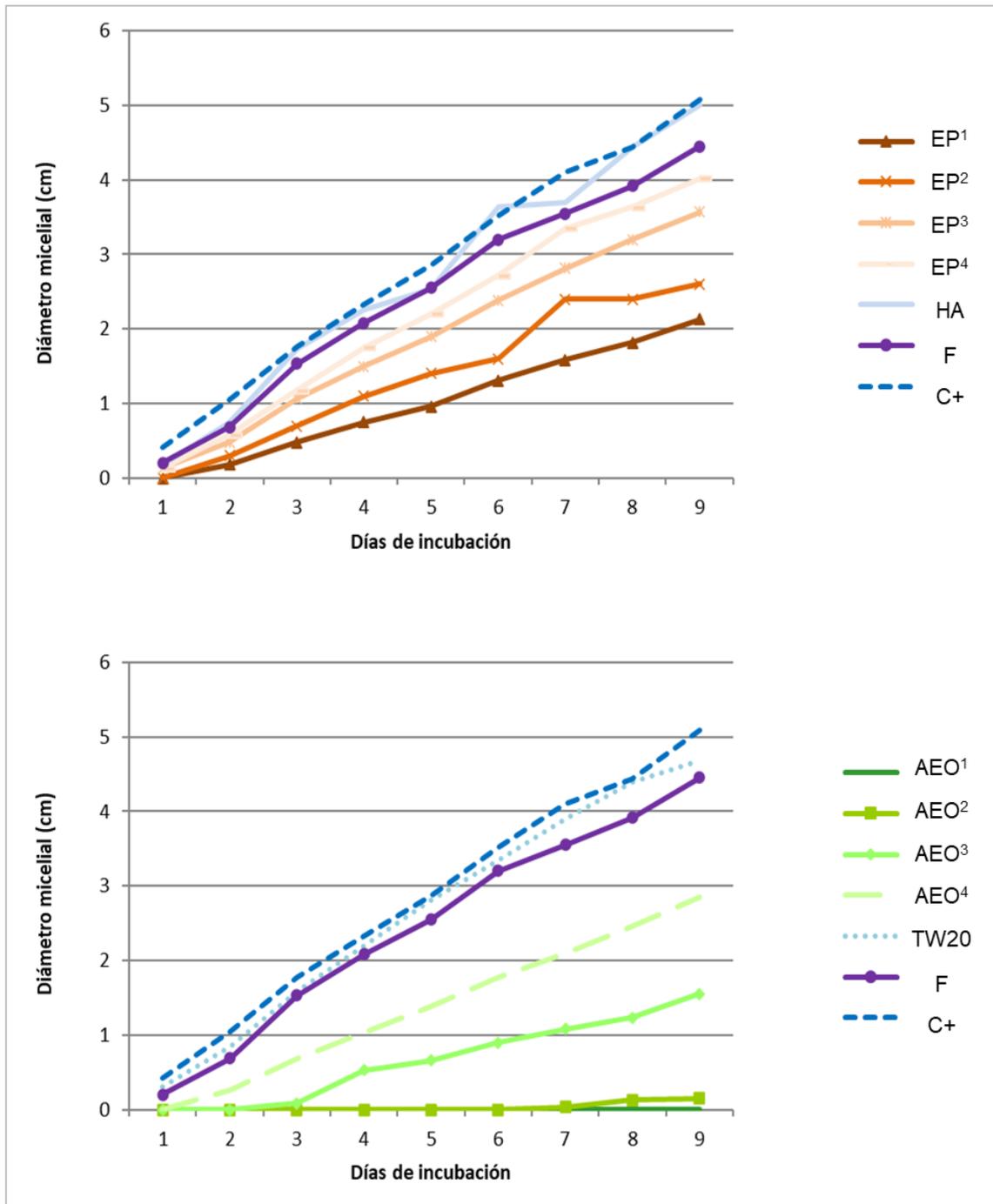


Figura 4-3. Actividad antimicrobiana de distintas concentraciones de (a) EP y de (b) AEO, sobre el crecimiento micelial de *P. allii*, evaluado a través de la prueba de dilución en agar. Se incluyó un tratamiento a base del fungicida comercial Carbendazim (F) y tres controles (C+, control positivo sin agregados; HA, hidroalcohol extractante del P; TW, Tween 20, tensioactivo utilizado para emulsionar el AEO). Las concentraciones de cada producto se ordenaron de forma decreciente, siendo las más altas EP¹ y AEO¹.

En la prueba de difusión por discos, el EP y el AEO tuvieron acción antifúngica sobre la germinación de conidios de *P. allii* (Tabla 4-1). Nuevamente, el tratamiento más efectivo fue AEO¹, con un I % de 100 a las 72 h. El efecto de las distintas dosis de EP fue relativamente invariable y homogéneo en el tiempo. Los análisis de correlación entre los I % obtenidos en la prueba de dilución en agar y de difusión por discos, presentaron coeficientes de Spearman positivos, de 0,95 a las 72 h, de 0,97 a las 144 h y de 0,93 a las 216 h de incubación.

Por su parte, en el ensayo de bioactividad de compuestos volátiles, el δ fue de 13,85 para el EP y de 50,0 para el AEO. De acuerdo a Inouye *et al.* (2006) valores del δ entre 100 y 70 indican una contribución mayoritaria de volátiles, entre 30 y 0 indican una contribución mayoritaria de difusión, y entre 69 y 31 indican una contribución mixta de difusión y volátiles. Esto, por lo tanto, reveló una importante contribución de la difusión en el EP, y una contribución mixta en el AEO. De hecho, en la prueba de volátiles, no se observó bioactividad del EP, mientras que AEO provocó un halo de inhibición promedio de $20,67 \pm 7,50$ mm (Figura 4-4).

En los antibiogramas realizados en medio sólido, los PNB provocaron cambios en la morfología de *P. allii*, respecto del control positivo sin agregados (C+), principalmente en el caso de los tratamientos con AEO: las colonias de estos tratamientos presentaron una coloración blanquecina (Figura 4-4).

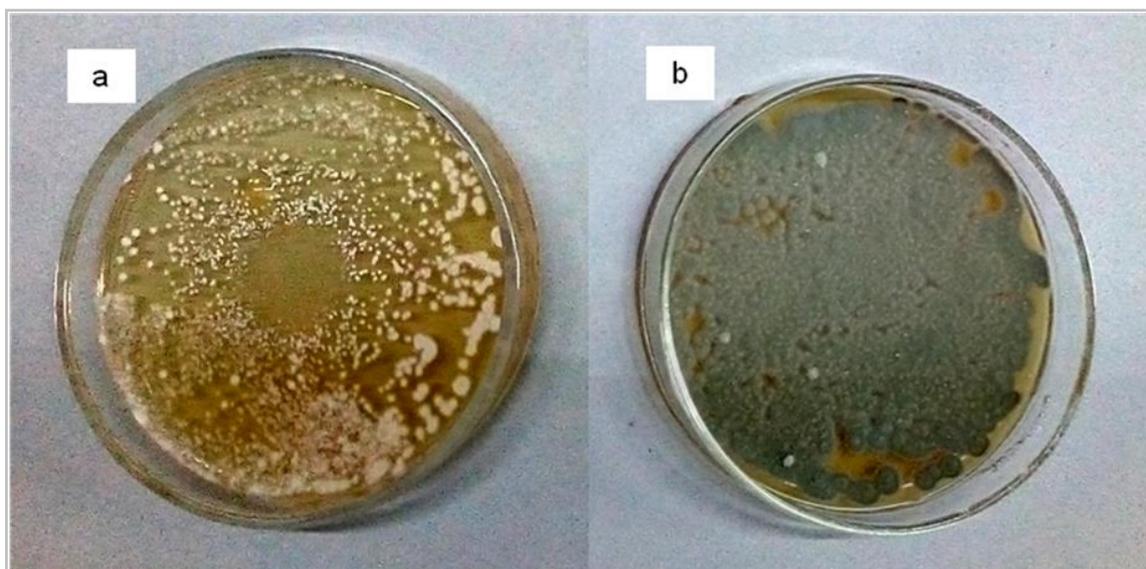


Figura 4-4. Cambios observados en la morfología de *P. allii* en el ensayo de bioactividad de compuestos volátiles: (a) tratamiento con AEO (se observa el halo de inhibición en el centro de la caja); (b) control positivo sin agregados (C+).

En relación a la determinación de la CIM y de la CFM, ambos PNB resultaron fuertemente inhibitorios de *P. allii*, destacándose el AEO, al igual que en ensayos anteriores, por ser igual de efectivo que el EP en dosis inferiores. La CIM y la CFM del EP fueron de 12,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (EP al 1,25 % v/v) y de 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (EP al 5 % v/v), respectivamente. La CIM y la CFM del AEO fueron de 1,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (AEO al 0,15 % v/v) y de 3,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (AEO al 0,31 % v/v), respectivamente. Se observaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre la biomasa fúngica desarrollada en el C+ y los tratamientos con EP y con AEO en dosis inferiores a las CIMs.

La bioactividad de extractos de propóleos de distinto origen geográfico ha sido probada sobre *P. digitatum*, *P. italicum* (Yang *et al.*, 2010), *P. expansum* (Silici y Karaman, 2013) y *P. notatum* (Xu *et al.*, 2019). En el caso del aceite esencial de orégano, se ha reportado que controla a *P. expansum* (Kadoglidou *et al.*, 2011), *P. digitatum* (Daferera *et al.*, 2000), *P. italicum* (Vitoratos *et al.*, 2013) y *P. verrucosum* (Jersek *et al.*, 2014). Los estudios realizados en esta tesis, mostraron que tanto el EP como el AEO, tienen una fuerte actividad antifúngica sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *P. allii*, habiéndose encontrado diferencias entre su eficacia (EP versus AEO), su forma de actuar (volatilización y/o difusión) y entre la efectividad de las dosis de cada producto (dosis-respuesta). Además, se observó que estos PNB pueden generar cambios en la morfología del fitopatógeno y que sus efectos disminuyen ligeramente en el tiempo. En conjunto estos resultados, constituyen el primer reporte respecto de la acción del EP y del AEO frente a *P. allii* (Cibanal *et al.*, 2021).

La acción antifúngica superior del AEO respecto del EP, podría deberse a que *P. allii* es más susceptible a los compuestos bioactivos del primero que del segundo. Fenoles como la crisina, galangina, pinocebrina y pinobanksina han sido descritos como los principales responsables de la actividad antimicrobiana del propóleos (Ghisalberti 1979; Šuran *et al.*, 2021). Estas moléculas, que poseen nula o escasa actividad volátil (Bankova *et al.*, 2014), se encontraron en EP₁ (Capítulo 2). Por otro lado, los terpenos timol, carvacrol, γ -terpineno y p-cimeno, entre otros, le confieren bioactividad al AEO. Estos presentan una elevada volatilidad, evaporándose fácilmente en contacto con el aire (Quiroga *et al.*, 2013; Olmedo *et al.*, 2014; Sakkas y Papadopoulou, 2017) y fueron detectados en AEO₁ (Capítulo 2). Las mencionadas diferencias de composición química permitirían explicar las diferentes formas de actuar de estos PNB. Cabe mencionar que el δ del AEO fue equivalente al de otros aceites esenciales, tal como el de *Salvia officinalis*, en los cuales se da una contribución mixta de la difusión y de la volatilización, con mayor tendencia a la segunda (Bouaziz *et al.*, 2009).

El efecto dosis-respuesta que presentaron los PNB fue análogo al informado por Yang *et al.* (2010) y Vitoratos *et al.* (2013), quienes probaron distintas concentraciones de EP y de AEO sobre fitopatógenos del género *Penicillium*, respectivamente. Da Silva *et al.* (2006), encontraron una fuerte correlación entre el contenido de fenoles del extracto de propóleos y su actividad antimicrobiana, siendo esperable que, al diluir su concentración, su efecto fuera menor. Por otro lado, la disminución paulatina de la bioactividad en la mayoría de los tratamientos evaluados, podría atribuirse a que su acción es fungistática, es decir que son capaces de suspender el crecimiento y el desarrollo del hongo sin matarlo. En consecuencia, debido a la degradación que sufren algunos de sus componentes por el oxígeno y la humedad (Chouhan *et al.*, 2017), con el paso del tiempo su efecto se ve disminuido. Al contrario, en los tratamientos fungicidas, dada su eficaz acción, se elimina por completo al fitopatógeno en etapas iniciales, permaneciendo el 1 % constante, tal como sucedió con AEO¹ en el ensayo de dilución en agar.

Los cambios morfológicos en las colonias podrían deberse a alteraciones en las hifas y a una reducción en la esporulación del hongo, la que le otorga su típica coloración verdosa. Yang *et al.* (2010) observaron que las hifas de *P. italicum* y de *P. digitatum* tratadas con propóleos, eran más delgadas respecto de las originales, poseían vacuolas aumentadas y carecían de núcleos celulares condensados, lo cual es indicativo de apoptosis celular. Por otro lado, Ghosh *et al.* (2017), reportaron que el propóleos puede deformar completamente las esporas fúngicas (conidios). Retamoso *et al.* (2019) mencionaron que inhibe la esporulación de los hongos. En cuanto al AEO, Daferera *et al.* (2000) demostraron en ensayos *in vitro* que la germinación y esporulación de conidios de *P. digitatum*, fueron altamente sensibles al AEO, incluso en mayor medida que el crecimiento micelial.

La combinación de EP con AEO resultó favorable para su efecto antifúngico sobre *P. allii* (Tabla 4-2, Figura 4-5). Al respecto, se encontró que una concentración de 3,12 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de EP, sumada a 0,375 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de AEO, tuvo efecto sinérgico (ICIF = 0,5) lo que permitió reducir cuatro veces la concentración necesaria de cada producto para inhibir el crecimiento del fitopatógeno. Otras cuatro combinaciones mostraron efecto aditivo, y controlaron al hongo en dosis inferiores a las requeridas individualmente. La biomasa fúngica desarrollada en los tratamientos con las concentraciones más bajas de EP y de AEO, cuyos ICIF se encontraron entre 1 y 4 (mezclas indiferentes), fue inferior a la del C+. Ninguna de las combinaciones evaluadas presentó antagonismo.

La sumatoria de mecanismos y modos de acción en la combinación de EP y AEO, dada por los distintos compuestos bioactivos que poseen, explicaría los

resultados de este estudio. Xu *et al.* (2019) documentaron que el propóleo desregula el metabolismo de los aminoácidos fúngicos, al comprometer enzimas como la triptófano sintasa, glutamina sintetasa y metionina sintasa. Asimismo, demostraron que este producto interfiere con procesos del metabolismo energético, ya que reduce la actividad de las enzimas malato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa, entre otras. También de acuerdo a estos autores, el propóleo afecta genes implicados en las rutas biosintéticas del ergosterol, un esteroide sintetizado por los hongos que suele ser blanco de productos antifúngicos ampliamente utilizados como el fluconazole (Zhang *et al.*, 2010). Por su parte, las propiedades lipofílicas de los aceites esenciales les permiten interferir y desorganizar la membrana celular. Esto conlleva a su expansión, al aumento de su fluidez y permeabilidad, a la perturbación de las proteínas incrustadas en ella, a la alteración de los procesos de transporte de iones y a la fuga del contenido celular (Lambert *et al.*, 2001; Burt, 2004; Tao *et al.*, 2014). De esta forma, al combinar EP y AEO se conjugan distintos efectos que comprometen la homeostasis del hongo. Cabe mencionar que los mecanismos subyacentes a la actividad antifúngica de estos PNB continúan siendo objeto de estudio.

Por último, el menor efecto antifúngico de F podría deberse a la aparición de cepas resistentes de *Penicillium* sp., así como de otras especies de hongos fitopatógenos, a ciertos fungicidas del grupo de los bencimidazoles, como lo es el Carbendazim (Tashiro *et al.*, 2012; Malandrakis *et al.*, 2013). Cabe mencionar que Baleix (2014), obtuvo resultados análogos a los de este trabajo al probar el efecto del Carbendazim frente a *Penicillium* sp. causante de la mufa del ajo.

Tabla 4-2. Actividad antifúngica de distintas combinaciones de EP con AEO sobre *P. allii*, evaluada a través de macrodilución en caldo, siguiendo una matriz del tipo tablero de ajedrez.

N° de combinación	EP (µL mL ⁻¹)	AEO (µL mL ⁻¹)	CIF _{EP} ^a	CIF _{AEO}	ICIF ^b	Interpretación
1	6,25	0,75	0,50	0,50	1,00	Aditividad
2	6,25	0,375	0,50	0,25	0,75	Aditividad
3	6,25	0,18	0,50	0,13	0,63	Aditividad
4	3,12	0,75	0,25	0,50	0,75	Aditividad
5	3,12	0,375	0,25	0,25	0,50	Sinergia

^a CIF: concentración inhibitoria fraccional de cada PNB, calculada como el cociente de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del producto natural en la combinación y su CIM individual. Las CIMs del EP y del AEO fueron de 12,5 µL mL⁻¹ y 1,5 µL mL⁻¹, respectivamente.

^b ICIF: índice de concentración inhibitoria fraccional (CIF_{EP}+CIF_{AEO}).

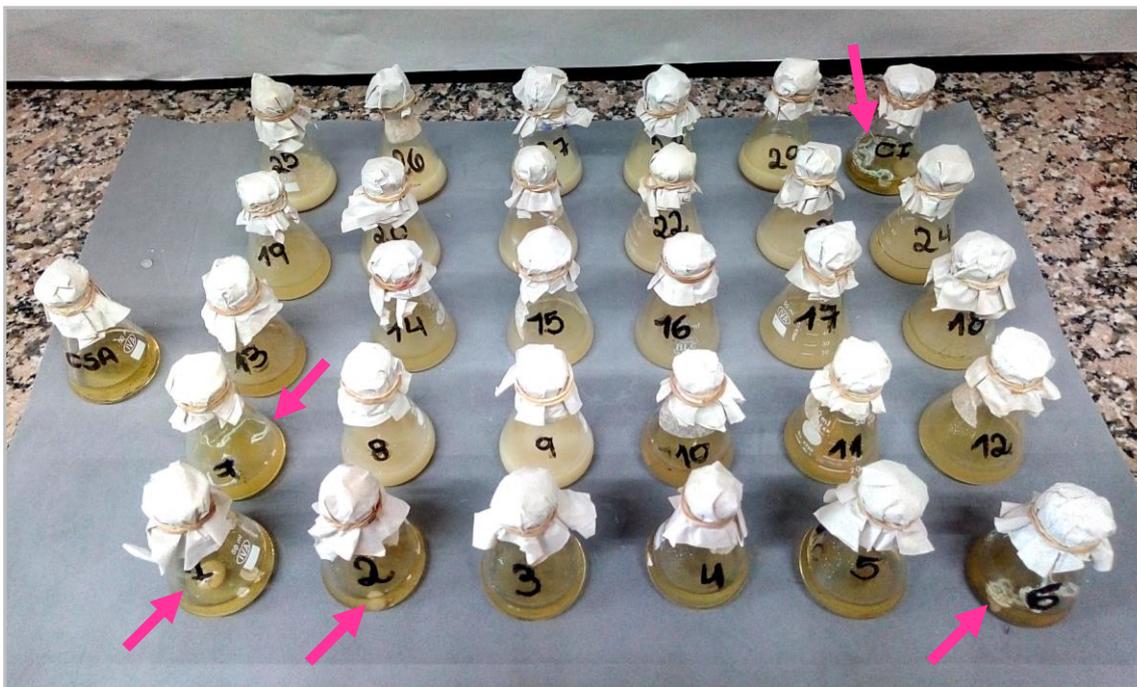


Figura 4-5. Prueba de sinergismo antifúngico entre el EP y el AEO, frente a *P. allii*. Se utilizó la técnica de macrodilución en caldo. Cada matraz corresponde a un tratamiento. Las distintas coloraciones de los medios de cultivo (caldo HyL), se debieron al agregado de diferentes concentraciones de los PNB. Se señaló con flechas el desarrollo fúngico visible a ojo desnudo en algunos de los tratamientos.

4-3.2. Actividad antifúngica *in vitro* del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

De forma análoga a lo observado en los estudios con *P. allii*, el EP y el AEO tuvieron una fuerte acción antifúngica sobre *S. sclerotiorum*, actuando el primero de ellos por difusión ($\delta = 8,99$) y el segundo por difusión y volatilización ($\delta = 52,3$). En el ensayo de dilución en agar, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre productos y entre estos y el C+ (Figuras 4-6 y 4-7). El AEO se destacó, ya que sus cuatro tratamientos inhibieron totalmente el crecimiento del hongo (1 % de 100), al igual que F, y sus dos concentraciones superiores (AEO¹ y AEO²), mantuvieron el efecto durante al menos 30 días, considerándose fungicidas. El EP mostró actividad fungistática dosis-dependiente, siendo las mayores concentraciones las más eficaces. Adicionalmente, luego de siete días de incubación, en los tratamientos con PNB solo se desarrolló micelio, a diferencia de lo que ocurrió en los controles (C+ e HA) y en F, que presentaron esclerocios completamente formados. Los resultados de la determinación de la CIM y la CFM guardaron relación con el ensayo mencionado anteriormente: la CIM y la CFM del EP fueron de $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ (EP al 0,5 % v/v) y de $40 \mu\text{L mL}^{-1}$ (EP al 4 % v/v), respectivamente; la CIM y la CFM del AEO fueron de $0,39 \mu\text{L mL}^{-1}$ (AEO al 0,039 % v/v) y $0,78 \mu\text{L mL}^{-1}$ (AEO al 0,078 % v/v), respectivamente. En cuanto a la actividad antifúngica combinada del EP y del AEO

sobre *S. sclerotiorum* (Tabla 4-3), se comprobó su acción sinérgica en la combinación compuesta por 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de EP y 0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de AEO (ICIF = 0.38). Asimismo, otras cinco combinaciones de EP con AEO mostraron efecto aditivo. Por último, no se observó antagonismo en las combinaciones evaluadas.

La acción individual del EP y del AEO sobre *S. sclerotiorum* ha sido investigada previamente por otros autores, que obtuvieron resultados alentadores y semejantes a los de este estudio (Matny *et al.*, 2014; Portella *et al.*, 2021; Soylyu *et al.*, 2007; Loc *et al.*, 2018; Türkmen *et al.*, 2021). No obstante, este trabajo constituye el primer reporte de la acción sinérgica entre ambos productos para el fitopatógeno en cuestión (Cibanal *et al.*, 2022). Por su parte, Matny *et al.* (2014) determinaron que extractos de propóleos realizados con etanol y cloroformo tuvieron efecto antifúngico sobre *S. sclerotiorum* en concentraciones del 5 % y del 3 %, respectivamente. En el presente trabajo, el extracto de propóleos, preparado con hidroalcohol al 70 % (v/v), tuvo actividad antifúngica al 0,5 %. Estas diferencias se relacionan, en parte, con la capacidad de los extractantes para solubilizar los compuestos bioactivos presentes en el propóleos, mostrando que el hidroalcohol (70 % v/v) es efectivo, tal como se postuló en el Capítulo 2 (Woisky y Salatino, 1998; Da Silva Frozza *et al.*, 2013). Por otro lado, Türkmen *et al.* (2021) reportaron que concentraciones de aproximadamente 0,015 % de aceite esencial de *Origanum dubidum*, lograron inhibir totalmente el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum*, lo cual se correlacionó positivamente con el contenido de carvacrol y de p-cimeno. Estos compuestos son altamente volátiles (Gorostiague, 2016) y se encontraban presentes en el AEO₂ (Capítulo 2).

Los resultados de la inhibición del crecimiento y desarrollo de esclerocios de *S. sclerotiorum* debido a la acción del EP y del AEO, mostraron una fuerte reducción de la fuente de inóculo y propagación del fitopatógeno. En relación a esto, Abd-El-Kareem *et al.* (2017), reportaron que el extracto etanólico de propóleos al 15 % reduce totalmente la formación y germinación de esclerocios. Según Soylyu *et al.* (2007), el AEO reduce el diámetro de las hifas del micelio, genera la lisis de las paredes celulares, y afecta las células globulares de la corteza de los esclerocios, lo que explicaría la ausencia de dichas estructuras en los tratamientos en los cuales se aplica este producto.

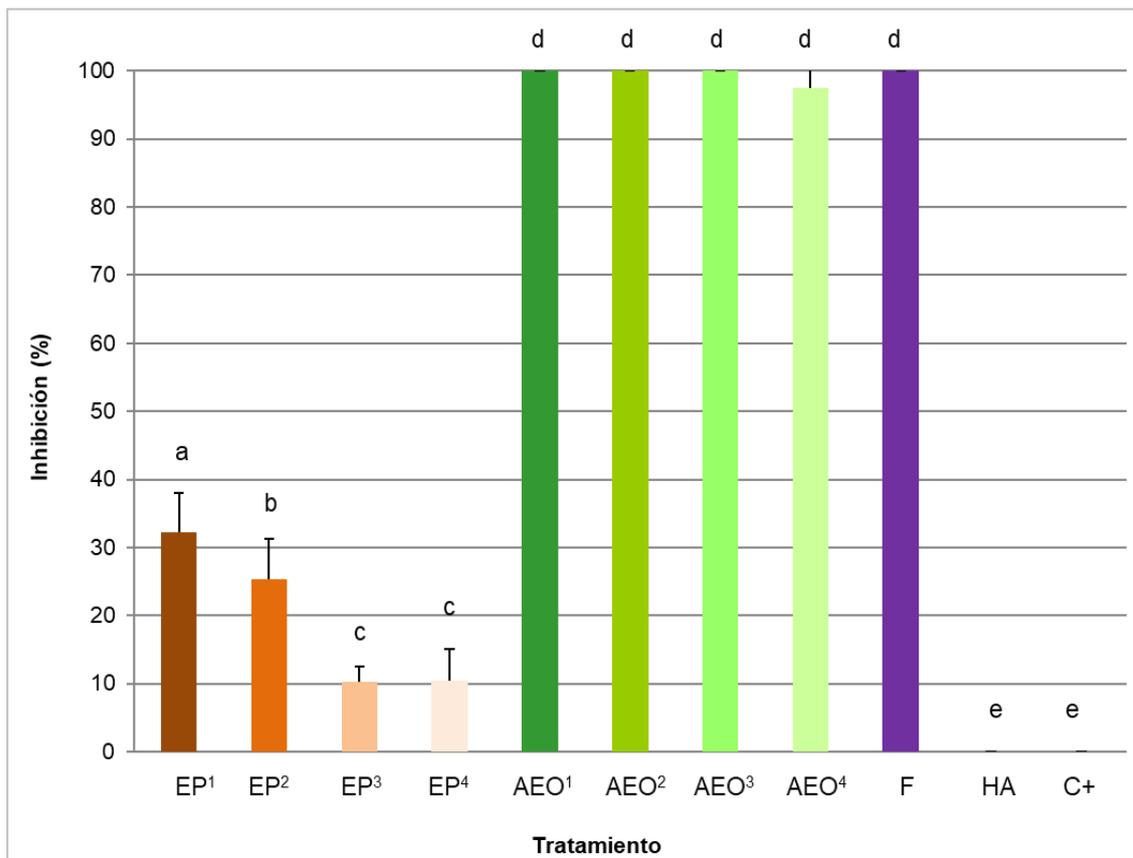


Figura 4-6. Actividad antifúngica de distintas concentraciones de EP y de AEO evaluadas con la prueba de dilución en agar sobre el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum*. Los resultados se expresaron como porcentajes de inhibición. Se incluyó un control positivo sin agregados (C+), un control metodológico con hidroalcohol (HA) y un fungicida comercial (F). Las concentraciones de cada producto se ordenaron de forma decreciente, siendo las más altas EP¹ y AEO¹. Cada dato es la media el promedio de 4 repeticiones \pm desvío estándar. Letras diferentes sobre la barra, indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) según la prueba LSD de Fisher.

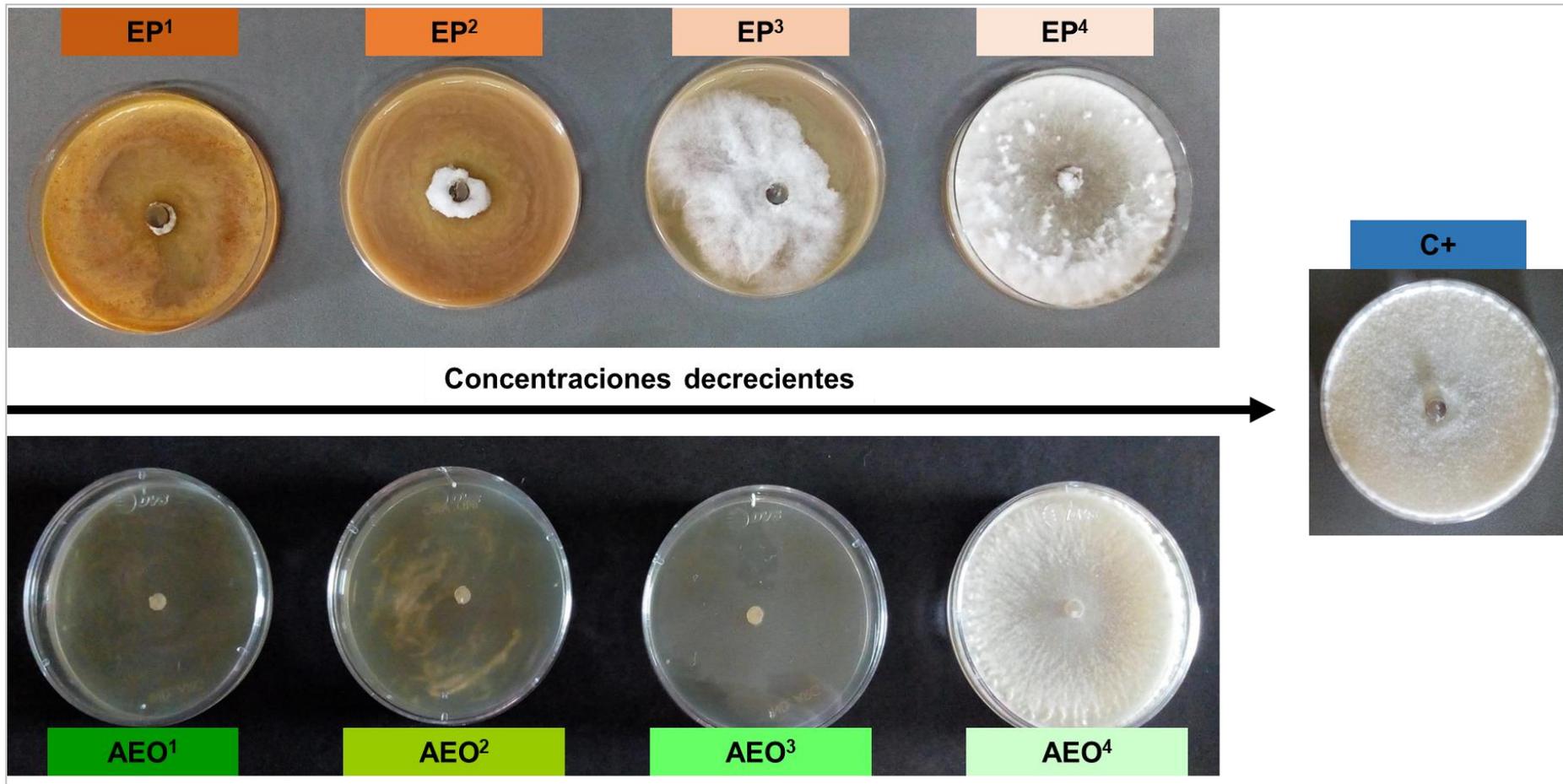


Figura 4-7. Actividad antifúngica de distintas concentraciones de EP y de AEO evaluadas con la prueba de dilución en agar sobre el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum*. Se incluyó un control positivo sin agregados (C+). En la imagen se observa el tamaño del hongo al finalizar el ensayo, en los distintos tratamientos. Las concentraciones de cada producto se ordenaron de forma decreciente, siendo las más altas EP¹ y AEO¹.

Tabla 4-3. Actividad antifúngica de distintas combinaciones de EP y AEO sobre *S. sclerotiorum*, evaluada a través de macrodilución en caldo y siguiendo una matriz del tipo tablero de ajedrez.

N° de combinación	EP ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	AEO ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	CIF _{PE} ^a	CIF _{OEO}	ICIF ^b	Interpretación
1	2,5	0,20	0,50	0,50	1,00	Aditividad
2	2,5	0,10	0,50	0,25	0,75	Aditividad
3	2,5	0,05	0,50	0,125	0,625	Aditividad
4	1,25	0,2	0,25	0,50	0,75	Aditividad
5	1,25	0,10	0,25	0,25	0,50	Aditividad
6	1,25	0,05	0,25	0,125	0,38	Sinergia

^a CIF: concentración inhibitoria fraccional de cada PNB, calculada como el cociente de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del producto natural en la combinación y su CIM individual. La CIM del EP y del AEO fueron de $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ y $0,39 \mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente.

^b ICIF: índice de concentración inhibitoria fraccional ($\text{CIF}_{\text{EP}} + \text{CIF}_{\text{AEO}}$).

4-3.3. Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de propóleos sobre bacterias fitopatógenas del tomate

La actividad antibacteriana del propóleos ha sido probada sobre numerosas especies, incluyendo bacterias fitopatógenas (Kujumgiev *et al.*, 1999; Rabelino *et al.*, 2009; Zignano, 2011; Smith, 2019; Zampini *et al.*, 2021). De acuerdo a Almuhayawi (2020), el propóleos puede alterar la permeabilidad y las funciones de la membrana celular de este tipo de microorganismos, e inhibe su metabolismo energético, la síntesis de ácidos nucleicos y la producción de biopelículas.

En el estudio sobre la actividad antibacteriana del EP, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la susceptibilidad de las bacterias a dicho producto (Tabla 4-4). Dentro de las afectadas, la secuencia de sensibilidad fue: *Cmm* > *X. gardneri* > *X. vesicatoria* > *P. corrugata*. El EP tuvo actividad antibacteriana dosis-dependiente, siendo los tratamientos más concentrados los más efectivos: en EP¹ se observaron halos de inhibición mayores que en las concentraciones restantes, y su acción se mantuvo aproximadamente constante hasta las 72 h de incubación. Ninguno de los controles (C+ y HA) mostró efectos sobre las bacterias.

La acción antimicrobiana del extracto de propóleos sobre *Cmm* (Figura 4-8), sugiere que podría utilizarse en el manejo del cancro bacteriano del tomate, enfermedad que provoca severas pérdidas en el mencionado cultivo, y para la que actualmente son escasos los tratamientos disponibles (De León *et al.*, 2008). Dado

que las fuentes de inóculo suelen ser las semillas, que transportan a la bacteria en forma epífita o como infección latente, y los plantines infectados (Chang *et al.*, 1991), tratar a dichos propágulos hortícolas con este producto podría contribuir al control de la enfermedad. Será necesario realizar estudios más profundos, incluyendo ensayos *in vivo*, sobre esta potencial aplicación del EP.

Numerosas investigaciones indican que el propóleo es más efectivo sobre bacterias Gram-positivas que Gram-negativas, y que las especies del género *Pseudomonas* son frecuentemente insensibles, tal como se observó en este ensayo. Al respecto, Tosi *et al.* (1996) encontraron que soluciones de propóleo fueron inactivas contra fitopatógenos de bacterias del género *Pseudomonas*. Por su parte, Sampietro *et al.* (2020), demostraron que extractos etanólicos de propóleo de la provincia de Santiago del Estero inhibieron completamente bacterias Gram positivas, en concentraciones que tuvieron efectos nulos sobre bacterias Gram-negativas, tales como *Erwinia carotovora*. Distintos autores coinciden en que podría deberse a que las enzimas hidrolíticas producidas en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, son capaces de comprometer los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos del propóleo (Sforcin y Bankova, 2011; Smith, 2019).

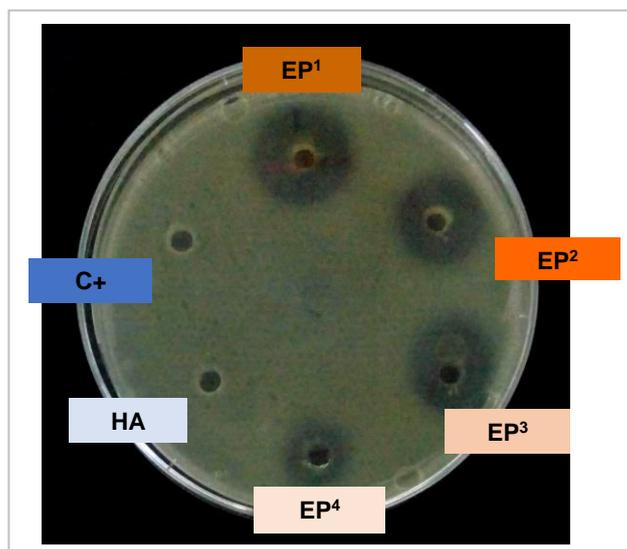


Figura 4-8. Actividad antifúngica de distintas concentraciones de EP sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aislada de plantas de tomate. Se incluyó un control positivo sin agregados (C+) y un control metodológico con hidroalcohol (HA). Las concentraciones del EP se ordenaron de forma decreciente, siendo la más alta EP¹.

Tabla 4-4. Actividad antibacteriana de distintas dosis de EP evaluadas con la técnica de pozo en agar sobre bacterias fitopatógenas. Los resultados se expresan como el diámetro promedio de las zonas de inhibición alrededor de los pozos (mm). El control positivo sin agregados (C+) y el control metodológico con hidroalcohol (HA) no se muestran en la tabla, ya que no presentaron inhibición. Las concentraciones del EP se ordenaron de forma decreciente, siendo la más alta EP¹.

Bacterias fitopatógenas	24 h				48 h				72 h			
	EP ¹	EP ²	EP ³	EP ⁴	EP ¹	EP ²	EP ³	EP ⁴	EP ¹	EP ²	EP ³	EP ⁴
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	15,50 a ^a	11,25 a	9,50 a	9,00 a	15,25 a	9,75 b	9,75 b	8,00 b	15,00 a	7,75 bc	9,50 b	6,50 c
<i>Xanthomonas gardneri</i>	4,00 a	2,75 ab	2,00 b	0,50 c	4,00 a	2,75 ab	0,50 b	0,50 c	2,50 a	1,25 b	1,25 b	-
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	1,50 a	0,50 b	0,25 b	- ^b	1,00	-	-	-	1,00	-	-	-
<i>Pseudomonas corrugata</i>	0,50	-	-	-	0,50	-	-	-	0,50	-	-	-
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Letras diferentes en la misma línea (tiempo de incubación), difieren significativamente en $p \leq 0,05$ según la prueba LSD de Fisher.

^b La ausencia de halo de inhibición se indicó con el símbolo (-).

4-3.4. Propiedades antimicrobianas del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano: análisis integrador de los resultados *in vitro*

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* sobre propiedades antimicrobianas del EP y del AEO mostraron que todas las muestras fueron altamente efectivas, pese a las diferencias en su origen y composición química (Capítulo 2). La bibliografía indica que, si bien existe una fuerte correlación entre el contenido de metabolitos secundarios vegetales y el efecto de estos productos (Da Silva *et al.*, 2006; Leyva-López *et al.*, 2017; Chimshirova *et al.*, 2022), es la combinación de todos sus componentes lo que determina sus propiedades biológicas (Šuran *et al.*, 2021). De hecho, se ha documentado que existen interacciones sinérgicas entre los compuestos mayoritarios y minoritarios de un mismo producto, debidas a la sumatoria de mecanismos de acción y a la combinación favorable de aspectos físico-químicos, tales como mejoras en la solubilidad y en la biodisponibilidad (Bouaziz *et al.*, 2009; Chouhan *et al.*, 2017). Por tal motivo, muestras de distinto origen, procedencia geográfica y perfil químico, pueden presentar efectos similares (Kujumgiev *et al.*, 1999). En un estudio *in vitro* realizado por Cibanal *et al.* (2019), se comprobó que extractos de propóleos provenientes de diversas regiones de Argentina inhibieron en un 100 % la germinación de conidios de *P. allii* durante 72 h la acción, independientemente de las diferencias en sus características.

Las interacciones entre compuestos químicos pueden darse entonces, entre los propios de cada producto, y en el caso de combinarlos, entre los presentes en la mezcla. La combinación de agentes antimicrobianos es frecuente en la medicina humana para el control de patógenos resistentes a los antibióticos disponibles. Actualmente se ha comenzado a investigar la combinación de medicamentos sintéticos con PNB y los resultados son alentadores (Probst *et al.*, 2011; Rodríguez-García *et al.*, 2015; Almuhayawi, 2020). En el ámbito agrícola, los estudios de este tipo son escasos. Ali *et al.* (2014) demostraron que la aplicación de extracto de propóleos en conjunto con aceite esencial de canela, protegió a los frutos de pimientos (*Capsicum annuum* L.) de *Colletotrichum capsici*. Combinar PNB de diferente origen para el control de enfermedades vegetales resulta novedoso y prometedor, no solo por la considerable disminución de las CIM, sino también por efectos positivos tales como mayor eficiencia en el tiempo y menor probabilidad de generar microorganismos resistentes (Chanda y Rakholiya, 2011). En el caso puntual de la combinación de EP con AEO, el primero ofrecería una acción de contacto dada principalmente por fenoles, mientras que los compuestos altamente volátiles del segundo causarían un efecto agudo e inmediato en el área cercana a su aplicación.

Otro aspecto a considerar en los ensayos realizados, es el referido a las técnicas de susceptibilidad antimicrobiana utilizadas. En los estudios realizados en esta tesis, todas fueron factibles de adaptar, requiriendo materiales y equipamiento de laboratorio accesibles. Además, permitieron obtener resultados en periodos de tiempo breves. Se destaca que, en la dilución en agar, el registro de los resultados (medición del diámetro micelial) fue sencillo, a diferencia de lo que ocurrió en la difusión por discos y por pozo en agar, en las que resultó dificultoso determinar con precisión los halos de inhibición. En la macrodilución en caldo, la turbidez de algunos tratamientos impidió la rápida detección visual del crecimiento de los hongos; sin embargo, en esta técnica, considerada la principal para la determinación de la CIM y de la CFM (Balouri *et al.*, 2016), se observó que la solubilización de los PNB en el medio de cultivo fue más homogénea que en la dilución en agar, asegurando así un mayor contacto entre los fitopatógenos y los agentes antifúngicos. Por último, la correlación favorable entre el método de dilución en agar y de difusión por discos, podría contribuir a simplificar el número de estudios necesarios para estimar la actividad antimicrobiana de este tipo de productos.

4-4. Conclusiones

- El extracto de propóleos y el aceite esencial de orégano, ambos productos naturales de distinto origen y composición química, presentaron propiedades antifúngicas *in vitro* sobre *P. allii* y *S. sclerotiorum*, tanto de forma individual como combinada.

- El extracto de propóleos tuvo actividad antibacteriana sobre *Cmm*, *X. gardneri*, *X. vesicatoria* y *P. corrugata*.

- En términos generales, el extracto de propóleos actuó por difusión, mientras que el aceite esencial de orégano presentó una importante actividad volátil. Esta diferencia estaría asociada a las moléculas bioactivas presentes en cada producto. Asimismo, se observó un efecto de dosis-respuesta en su actividad antimicrobiana, principalmente por parte del extracto de propóleos.

- El hallazgo más novedoso y destacado de estos estudios fue que la combinación de extracto de propóleos con aceite esencial de orégano tuvo un efecto antifúngico sinérgico frente a *P. allii* y *S. sclerotiorum*. Dosis de 3,12 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de EP con 0,375 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de AEO inhibieron el crecimiento del primer hongo, mientras que 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de EP con 0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$ lo hicieron con el segundo. Esto permitió reducir considerablemente las cantidades necesarias de cada producto por separado para controlar a los mencionados fitopatógenos.

- Las técnicas de susceptibilidad antimicrobiana adaptadas en esta tesis para estudios sobre fitopatógenos, resultaron adecuadas para conocer las propiedades antimicrobianas *in vitro* de estos productos en la etapa de cribado en el laboratorio.
- Ambos productos naturales resultaron promisorios para avanzar en las evaluaciones *in vivo* sobre sus propiedades fitoinhedoras y antifúngicas.

CAPÍTULO 5 – Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre propágulos hortícolas

5-1. Introducción

Los metabolitos secundarios presentan diversas propiedades, dentro de las que se incluye la capacidad de inhibir el crecimiento y el desarrollo vegetal (Waterman, 2007). Esto se relaciona con su rol en la adaptación de las plantas a su entorno, ya que median, en gran parte, las relaciones de éstas con distintos organismos, lo que incluye a otras plantas de igual o distinta especie (Tiwari y Rana, 2015).

En los ambientes naturales, dicha respuesta se ha vinculado al fenómeno de alelopatía, por el cual una planta (donante) libera al medio sustancias producto de su metabolismo secundario, que pueden actuar de forma perjudicial sobre otra planta (receptora) a la que se incorporan. La forma de liberación de esas sustancias varía entre especies (volatilización, lixiviación, exudación y/o biodegradación) (Sampietro, 2003). En los PNB, que son obtenidos o derivados de especies botánicas, tales como el propóleos y los aceites esenciales, la presencia de metabolitos secundarios en su composición se ha asociado a efectos fitoinhibitorios sobre procesos fisiológicos vegetales, incluyendo la germinación de propágulos y el crecimiento y el desarrollo de plántulas (Verdeguer *et al.*, 2020).

Respecto de las propiedades fitoinhibitorias del propóleos, Fernandes-Silva *et al.* (2014) encontraron que su fracción volátil afecta negativamente la germinación de las semillas de lechuga y el crecimiento de sus plántulas. De acuerdo a Stikar (2008), soluciones acuosas y alcohólicas de propóleos de la Región Pampeana Argentina, inhiben la germinación y de semillas de girasol (*Helianthus annuus*), en forma dosis-dependiente. También ha sido probado que los extractos de propóleos inhiben la germinación de la cebada silvestre (*Hordeum spontaneum*), de la avena (*Avena sativa*) y del algodón forrajero (*Abutilon striatum*), cuando son aplicados junto con el riego (Dadgostar y Nozari, 2020).

En cuanto a los aceites esenciales, Ramezani *et al.* (2008) encontraron que muestras obtenidas de eucaliptus, ciprés, romero y cedro afectaron severamente la germinación de numerosas especies de malezas, lo que dejó en evidencia su capacidad fitoinhibitoria. Zanellato *et al.* (2009) investigaron el efecto de aceites extraídos de plantas aromáticas sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de vicia (*Vicia faba*). Los resultados mostraron efectos fitoinhibitorios sobre los mencionados procesos fisiológicos y también acción antimicrobiana sobre las comunidades bacterianas asociadas a esta especie.

En este contexto, las propiedades fitoinhibitorias de los propóleos y de los aceites esenciales deben ser evaluadas a fin de evitar efectos indeseables en su utilización, como podría ocurrir al aplicarlos sobre propágulos hortícolas que se desean proteger de fitopatógenos. Para esto, los bioensayos con propágulos de lechuga (*Lactuca sativa*) se presentan como una herramienta de cribado inicial adecuada dada la alta sensibilidad de esta especie a diversos compuestos, y a su rápido crecimiento y desarrollo (Sobrero y Ronco, 2004). Por consiguiente, los objetivos propuestos para este capítulo fueron:

- Realizar una evaluación de las propiedades fitoinhibitorias del EP y del AEO sobre propágulos de lechuga (*Lactuca sativa*);
- Evaluar los efectos fitoinhibitorios de tratamientos formulados a base de EP y de AEO, sobre la brotación de bulbillos de ajo (*Allium sativum*) y la germinación de semillas de poroto pallares (*Phaseolus lunatus*).

5-2. Materiales y métodos

Las propiedades fitoinhibitorias del EP y del AEO se evaluaron sobre distintos propágulos hortícolas. Inicialmente, se realizó un estudio sobre disemínulos de lechuga (botánicamente frutos del tipo cipsela, que habitualmente y en lo sucesivo se mencionarán como “semillas”). Seguidamente, se evaluaron los efectos de los mencionados PNB sobre bulbillos de ajo y semillas de poroto pallares.

En estas pruebas se probaron: EP₁ (origen Río Colorado) y AEO₃ (origen Gral. Fernández Oro) sobre lechuga; EP₁ y AEO₂ (origen Azul), sobre ajo y poroto pallares. Las características de estos PNB se encuentran descriptas en el Capítulo 2.

5-2.1. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la germinación de lechuga

Se realizaron dos bioensayos consecutivos, bajo las mismas condiciones experimentales, en los que se utilizaron semillas de lechuga de la variedad Prizehead, clase identificada, con 85 % de poder germinativo y un peso de mil semillas (P1000) de 1,05 g (AmsaSeed, Estados Unidos).

Las semillas fueron tratadas por el método de inmersión con dosis crecientes de EP y de AEO (Sharma *et al.*, 2015). Para esto se prepararon 3 mL de soluciones acuosas (Tabla 5-1) en tubos Falcon (15 mL de capacidad), que se agitaron en un vortex a 2.500 rpm hasta homogeneizar la mezcla. Las semillas se remojaron por completo en los tratamientos durante 2' 30", se sembraron e incubaron según indican las Normas ISTA (ISTA, 2004). Como germinadores se utilizaron placas de Petri estériles, con seis láminas circulares de papel absorbente previamente humedecido.

Los ensayos se incubaron en una cámara a 20 °C y en oscuridad, durante siete días. Como controles metodológicos se incluyeron tratamientos con: ADE (Ci, control de inmersión), HA (hidroalcohol, extractante del P), TW20 (Tween 20, emulsionante del AEO; Biopack, Argentina) y semillas sin remojar (Csi).

Tabla 5-1. Tratamientos utilizados para evaluar las propiedades fitoinhedoras del EP y del AEO sobre la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y el crecimiento y desarrollo de las plántulas. En ambos bioensayos se incluyeron controles con hidroalcohol (HA, extractante del P) y Tween 20 (TW20, emulsionante del AEO).

TRATAMIENTO	FORMULACIÓN
1^{ER} BIOENSAYO	
EP 2,5%	2,5 % EP + 97,5 % ADE ^a
EP 5%	5 % EP + 95 % ADE
EP 10%	10 % EP + 90 % ADE
EP 20%	20 % EP + 80 % ADE
AEO 0,75%	0,75 % AEO + 0,75 % TW20 + 98,5 % ADE
AEO 1,5%	1,5 % AEO + 1,5 % TW20 + 97 % ADE
AEO 3%	3 % AEO + 3 % TW20 + 94 % ADE
AEO 6%	6 % AEO + 6,72% TW20 + 87,28 % ADE
HA 20%	20 % HA + 80 % ADE
TW20 6,72%	6,72 % TW20 + ADE
2^{DO} BIOENSAYO	
EP 40%	40 % EP + 60 % ADE
EP 60%	60 % EP + 40 % ADE
EP 80%	80 % EP + 10 % ADE
EP 100%	100 % EP
AEO 12%	12 % AEO + 12 % TW20 + 76 % ADE
AEO 24%	24 % AEO + 24 % TW20 + 52 % ADE
AEO 48%	48 % AEO + 26 % TW20 + 26 % ADE
AEO 96%	96 % AEO + 2 % TW20 + 2 % ADE
HA 100%	100 % HA
TW20 26%	26 % TW20 + 74 % ADE

^a ADE: agua destilada estéril.

Una vez finalizado el periodo de incubación, se registraron los resultados de acuerdo a una clasificación *ad hoc* que fue adaptada de las Normas ISTA (ISTA, 2004) para evaluar efectos inhibitorios (Figura 5-1). La misma distingue seis categorías de semillas y plántulas. Dentro de las clasificadas como *plántulas normales*, se incluyeron aquellas con las estructuras morfológicas bien desarrolladas, cotiledones con coloración verdosa homogénea, longitud mayor a 2 cm (desde el ápice radical hasta el extremo caulinar), y capacidad de continuar creciendo normalmente. Las *plántulas anormales*, por el contrario, presentaron defectos severos que afectaron su crecimiento y/o desarrollo, tales como: crecimiento desequilibrado y alteraciones morfológicas (plántulas deformes); al menos una estructura esencial afectada por microorganismos (plántulas putrefactas); y una longitud inferior a 2 cm (plántulas con menor crecimiento). Entre las *semillas no germinadas*, considerando como tales aquellas sin la radícula visible, se distinguieron: semillas muertas, que permanecieron sin germinar al finalizar el ensayo, e incluso luego de ser lavadas, resembradas y cultivadas nuevamente por siete días, bajo las mismas condiciones experimentales de los bioensayos; y las *semillas putrefactas*, que fueron afectadas total o parcialmente por microorganismos.

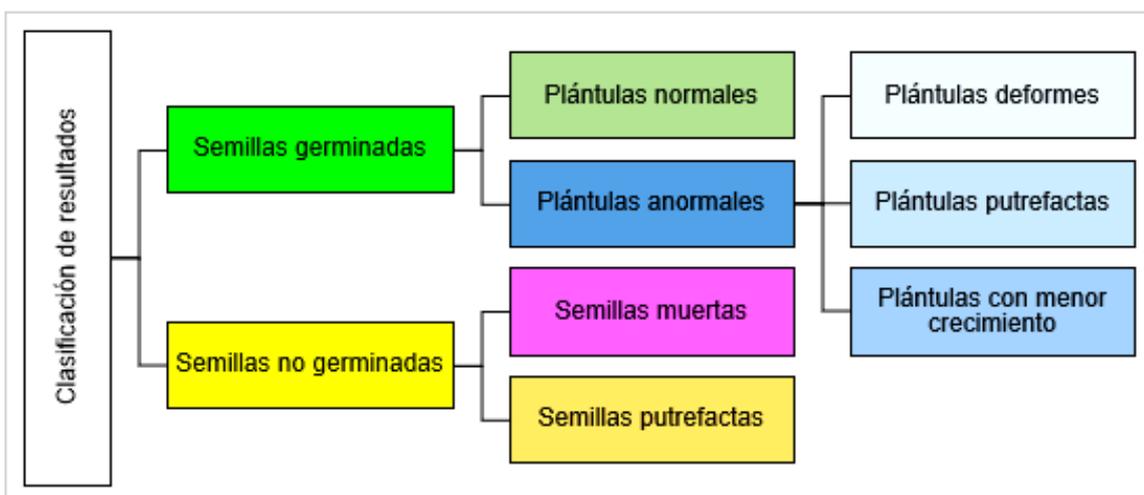


Figura 5-1. Esquema de clasificación para los resultados de los bioensayos de evaluación de la actividad fitoinhibitoria del EP y del AEO sobre semillas y plántulas de lechuga.

El diseño experimental de los bioensayos fue completamente aleatorizado, con cinco repeticiones por tratamiento, considerando como réplicas a los germinadores, cada uno de los cuales contenía 50 semillas. En el análisis estadístico, los datos fueron transformados para satisfacer los requerimientos de normalidad y

homocedasticidad del ANAVA, mediante la fórmula $y = \arcseno \sqrt{x}$, donde x fue la proporción de la categoría. Cuando se detectaron valores significativos de F, las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ($p < 0,05$). Por último, se realizó un análisis multivariado de componentes principales (ACP) con los resultados del segundo bioensayo. Se utilizó el software Infostat para los mencionados análisis (Di Rienzo *et al.*, 2010).

5-2.2. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la brotación de ajo

Se realizó un ensayo a campo, en el que se estudió la acción de tratamientos con EP y AEO sobre la brotación de propágulos de ajo (botánicamente bulbillos, que coloquialmente se conocen como “ajo-semilla” o “dientes”). Estos pertenecían al tipo comercial colorado (grupo fisiológico IV). En los días previos a comenzar el ensayo, los bulbos se desgranaron manualmente, se seleccionaron los bulbillos de tamaño mediano y de buen aspecto general, y se determinó el Índice Visual de Dormición (IVD) del lote de acuerdo a Burba (2013).

El procedimiento consistió en sumergir los bulbillos de ajo, en soluciones acuosas formuladas a base de los PNB, durante distintos tiempos de exposición (Tabla 5-2, Figura 5-2). A modo de control metodológico se dispusieron tratamientos con ADE (Ci, control del efecto de la inmersión). Cabe mencionar que en estudios preliminares se determinó que el EP, el AEO, el HA (extractante del P) y el TW20 (Tween 20, emulsionante del AEO), no tuvieron efectos fitoinhibitorios individuales sobre bulbillos de ajo para las dosis y tiempos de exposición utilizados en este ensayo.

Luego de ser tratados, los bulbillos fueron plantados en tres parcelas (1 m x 2 m cada una), previamente laboreadas (libres de malezas, con el suelo refinado y buena humedad), ubicadas en un establecimiento rural del Partido de Saavedra (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Se dispusieron seis bulbillos de un mismo tratamiento por línea de siembra, ubicándolos en posición normal, a una profundidad promedio de 5 cm y a una distancia lineal de 10 cm entre ellos (Burba, 2003). El riego se suministró cada siete días de forma homogénea. El ensayo se realizó durante la temporada de invierno (meses de junio y julio del año 2020). Un mes después de la plantación, se cuantificó para cada tratamiento el número de plántulas emergidas y se registró el estado fenológico de las plantas según la escala de codificación BBCH para hortalizas de plantas bulbosas (López-Bellido *et al.*, 2016).

El diseño experimental fue en bloques completos y aleatorizados, considerando a cada parcela como un bloque y a cada línea de plantación como una unidad experimental. Se realizó el ANAVA de los resultados y cuando se detectaron valores

significativos de F, las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ($p < 0,05$). Se utilizó el software Infostat para los mencionados análisis (Di Rienzo *et al.*, 2010).

Tabla 5-2. Tratamientos utilizados para evaluar los efectos fitoinhibitorios del EP y del AEO sobre la brotación de bulbillos de ajo (*Allium sativum*). Como controles se incluyeron tratamientos formulados a base de ADE (agua destilada estéril) (Ci). En algunas formulaciones se agregó Tween 20 (TW20) para facilitar la emulsión del AEO.

TIEMPO DE INMERSIÓN Y FORMULACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	5'	15'	30'
	5 % EP + 0,6 % AEO + 0,6 % TW20 + 93,8 % ADE	T1	T2
5 % EP + 1,2 % AEO + 1,2 % TW20 + 92,6 % ADE	T4	T5	T6
10 % EP + 0,6 % AEO + 0,6 % TW20 + 88,8 % ADE	T7	T8	T9
10 % EP + 1,2 % AEO + 1,2 % TW20* +87,6 % ADE	T10	T11	T12
100 % ADE (Ci)	T13	T14	T15

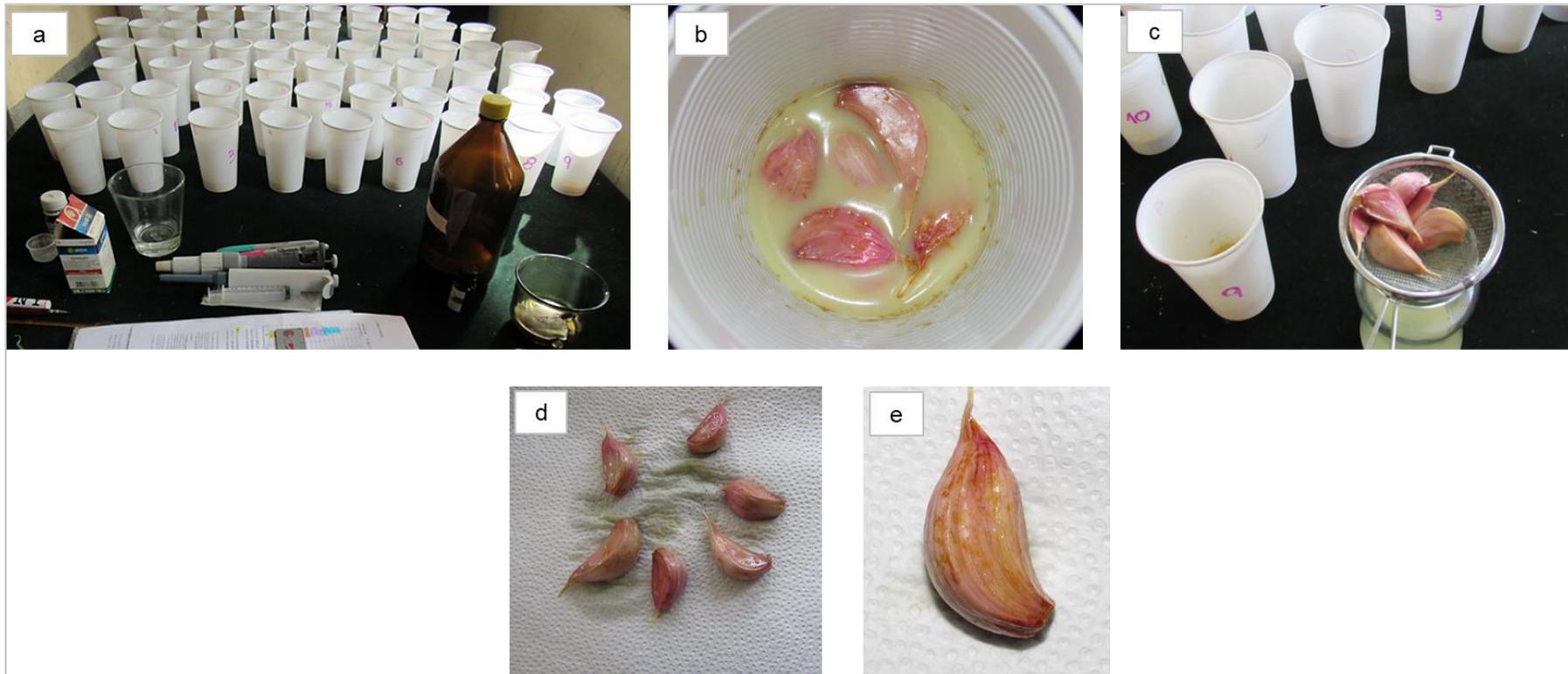


Figura 5-2. Ensayo para evaluar la actividad fitoinhibitoria del EP y del AEO sobre la brotación de ajo: (a) formulación de los tratamientos; (b) bulbillos de ajo siendo tratados por inmersión en una solución acuosa con los PNB; (c) bulbillos de ajo siendo escurridos luego de la inmersión; (d) y (e) bulbillos tratados con soluciones de EP y AEO, en los que se observa un tenue cambio en la coloración de la hoja de protección, otorgada principalmente por el EP.

5-2.3. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la germinación de poroto pallares

Se evaluaron los efectos fitoinhibitorios del EP y del AEO sobre la germinación de poroto pallares variedad *macrocarpus*. La viabilidad, poder germinativo y P1000 del lote de semillas, se determinaron siguiendo la metodología propuesta por Nascimento (2020).

El ensayo consistió en nueve tratamientos: tres dosis de cada uno de los PNB y tres controles (Tabla 5-3). Para esto, se formularon 24 mL de cada tratamiento en tubos Falcon (50 mL de capacidad), los cuales se agitaron durante varios minutos en un vortex a 2.500 rpm. Las soluciones acuosas obtenidas fueron dispuestas en vasos plásticos (180 mL de capacidad), en los que luego se remojaron las semillas durante 5'. Posteriormente, se procedió a realizar la siembra en macetas de plástico soplado (tamaño n°12), que contenían sustrato multipropósito compuesto por turba y perlita (Grow Mix Multipro, Terrafertil, Argentina).

Las macetas se incubaron durante 25 días bajo condiciones controladas, en un invernáculo con riego automatizado por aspersión y temperaturas entre 20 y 25 °C. Nueve días después de haber comenzado el ensayo, se realizó el conteo del número de semillas germinadas (aquellas con la radícula visible) de cada tratamiento. Al finalizar el ensayo se realizó una descripción cualitativa de las plantas.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con tres repeticiones por tratamiento, considerando como réplicas a las macetas, cada una de las cuales contenía cuatro semillas. Se realizó el ANAVA de los resultados y cuando se detectaron valores significativos de F, las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ($p < 0,05$). Se utilizó el software Infostat para los mencionados análisis (Di Rienzo *et al.*, 2010).

Tabla 5-3. Tratamientos utilizados para evaluar los efectos fitoinhibitorios del EP y del AEO sobre la germinación de semillas de poroto pallares (*Phaseolus lunatus*). Se incluyeron controles con hidroalcohol (HA, extractante del P), Tween 20 (TW20, emulsionante del AEO) y un control sin agregados (Ci). Todas las formulaciones se realizaron con ADE (agua destilada estéril).

TRATAMIENTO	FORMULACIÓN
EP 30 %	30 % EP + 70 % ADE
EP 40 %	40 % EP + 60 % ADE
EP 50 %	50 % EP + 50 % ADE
AEO 3 %	3 % AEO + 3 % TW20* +94 % ADE
AEO 6 %	6 % AEO + 6 % TW20 + 88 % ADE
AEO 12 %	12 % AEO+ 12 % TW20 + 76 % ADE
TW20 12 %	12 % TW20 + 88 % ADE
HA 50 %	50 % HA+ 50 % ADE
Ci	100 % ADE

5-3. Resultados y discusión

5-3.1. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la germinación de lechuga

En la Figura 5-3 se muestran las seis categorías de semillas y plántulas observadas al finalizar los bioensayos que se describen a continuación, clasificadas de acuerdo al criterio establecido en la Figura 5-1.

En el primer bioensayo (Figura 5-4), todos los tratamientos presentaron una alta proporción (superior a 0,5) de plántulas normales. De hecho, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre estos para la variable en cuestión. Por tal motivo, se consideró que las dosis de EP y de AEO evaluadas no generaron efectos fitoinhibitorios sobre la germinación de semillas de lechuga, y el crecimiento y el desarrollo de sus plántulas. Por otro lado, se observó que la cantidad de semillas putrefactas tendió a disminuir conforme aumentó la concentración de los PNB en la solución de inmersión. En cuanto a esto, las semillas contienen una gran variedad de microorganismos en sus estructuras externas e internas, que pueden causar su deterioro y descomposición. Fitopatógenos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* suelen asociarse a dichos procesos (Sinclair, 1979; Nelson, 2018). Las

propiedades antimicrobianas del EP y del AEO, que han sido ampliamente probadas sobre este tipo de microorganismos (Deleanu *et al.*, 2018; Hussain y Hassan, 2020), y que fueron evaluadas en el Capítulo 4, podrían explicar dicha observación.

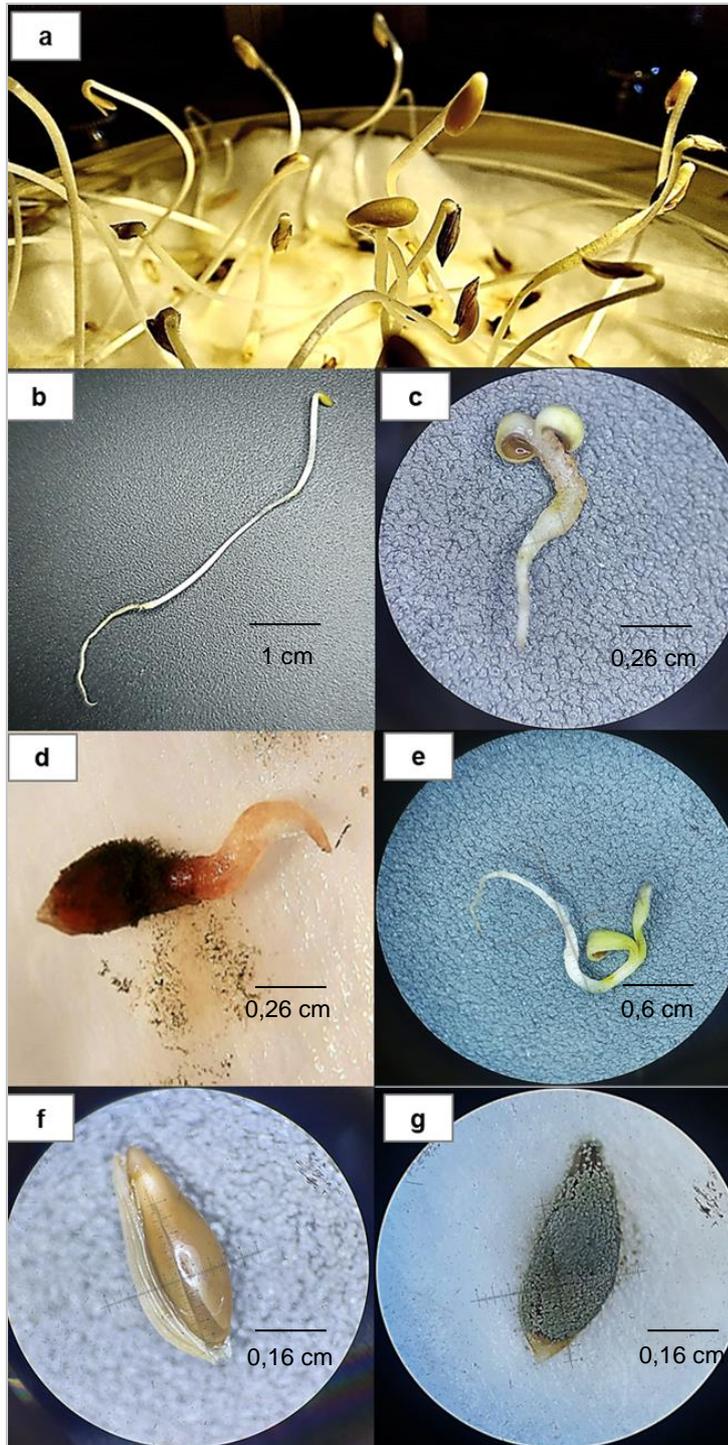


Figura 5-3. Resultados de la evaluación de la actividad fitoinhibitoria del EP y del AEO sobre la germinación de lechuga: (a) plántulas normales; (b) plántula normal; (c) plántula deforme; (d) plántula putrefacta; (e) plántula con menor crecimiento; (f) semilla muerta; (g) semilla putrefacta.

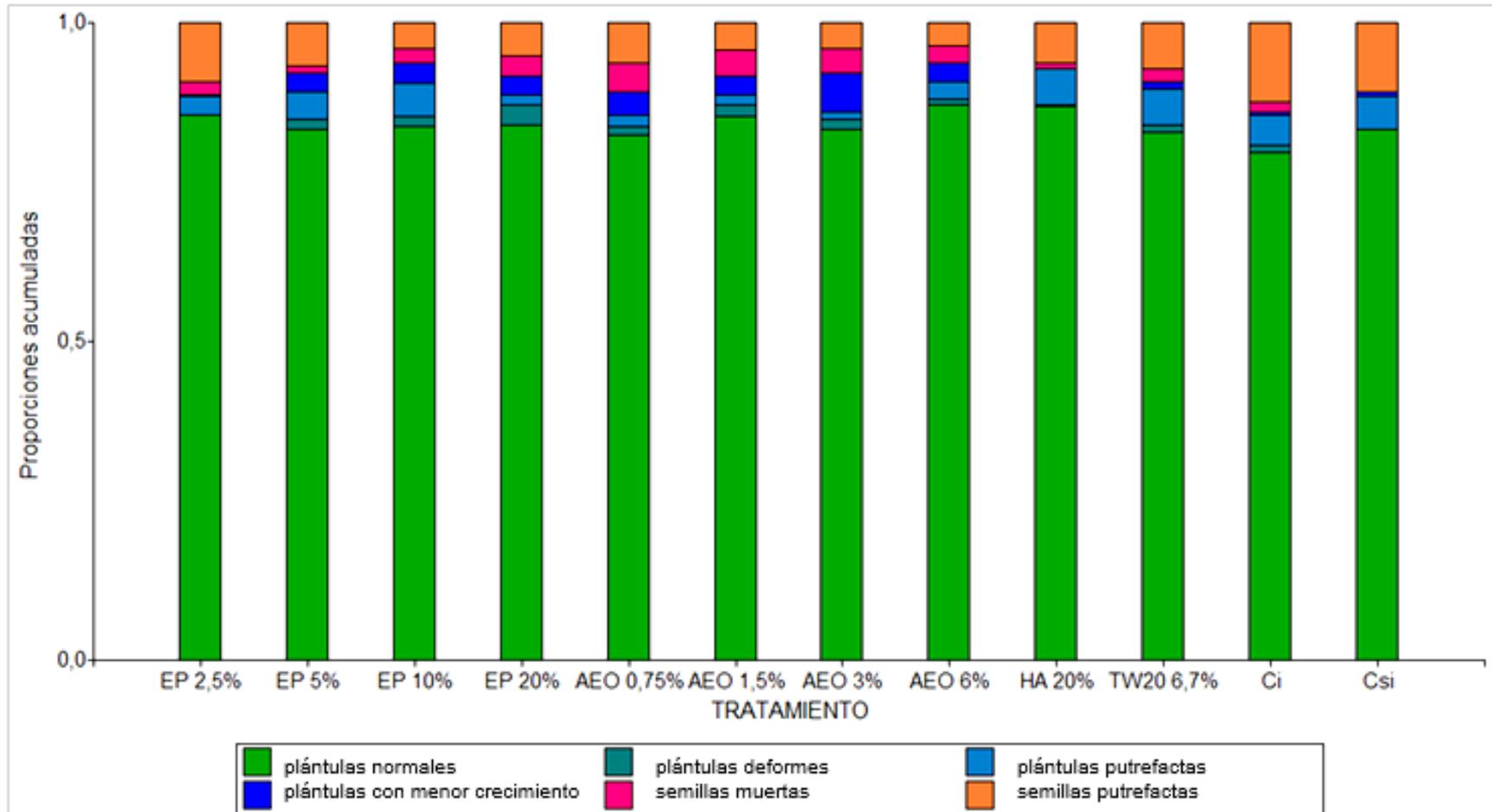


Figura 5-4. Resultados del primer bioensayo de actividad fitoinhibitoria del EP y del AEO sobre la germinación de semillas de lechuga. Se incluyó un control de inmersión (Ci), un control sin inmersión (Csi), un control con TW20 (Tween 20, emulsionante del AEO) y un control con HA (hidroalcohol, extractante del P).

En el segundo bioensayo, todos los tratamientos mostraron una alta proporción de plántulas normales (superior a 0,5), excepto por EP 100 %, HA 100 %, AEO 96 % y AEO 48 %. En tal sentido, los tres primeros tratamientos se diferenciaron estadísticamente del resto ($p < 0,05$) por presentar un mayor número de plántulas anormales, mientras que el último lo hizo debido a una cantidad significativamente superior ($p < 0,05$) de semillas muertas. Asimismo, y de forma similar al primer bioensayo, se observó que la cantidad de semillas y plántulas putrefactas tendió a disminuir conforme aumentó la concentración de los PNB y de HA en la solución de inmersión.

En el análisis multivariado (Figura 5-5), las dos componentes principales (CP1 y CP2) explicaron un 78 % de la variabilidad total en las observaciones. Al incluir la tercera componente, dicho valor alcanzó un 91 %. Todas las variables, excepto por plántulas deformes, presentaron un porcentaje de su variabilidad total reconstruida por las dos primeras componentes superior a 76,4 %. La variable plántulas deformes, logró un porcentaje de reconstrucción del 92 % al considerar la primer y la tercera componente. La CP1 se correlacionó positivamente con la proporción de plántulas normales, plántulas putrefactas y semillas putrefactas, mientras que se correlacionó negativamente con el resto de las variables. La CP2 mostró una correlación positiva con la proporción de plántulas con menor crecimiento, plántulas putrefactas, semillas muertas y semillas putrefactas, mientras que la CP3 se correlacionó positivamente con plántulas deformes. De acuerdo al biplot de las CP1 y CP2, los tratamientos AEO 96 % y AEO 48 % se asociaron a plántulas con menor crecimiento y deformes, y a semillas muertas. Por su parte, Csi, TW20 26 % y Ci, lo hicieron con las categorías de plántulas y semillas afectadas por fitopatógenos. En el biplot de las CP1 y CP3, se observó que HA 100 %, EP 100 % y, en menor medida, AEO 96 % y AEO 48 %, se vincularon con plántulas deformes.

En el caso de EP 100 % y de HA 100% (control metodológico del extractante de P, formulado con 70 % etanol y 30 % ADE), las plántulas deformes presentaban hipocótilos cortos y gruesos, y una leve epinastia en los cotiledones. Dado que los resultados de ambos tratamientos fueron similares, los efectos en cuestión podrían atribuirse al HA por sí solo, o a éste y al propóleos, siendo necesarios más estudios para determinar la incidencia de cada producto. El etanol es un compuesto que naturalmente se produce en las plantas, en especial bajo condiciones de anoxia, y que en altas concentraciones afecta sus procesos metabólicos esenciales (Janeczko, 2011). De hecho, ha sido ampliamente documentado que el etanol altera la estructura y funcionamiento de la membrana celular, entre otros procesos, lo que conlleva a

daños y estrés fisiológico (Elvir, 1993), que podrían contribuir a explicar los resultados obtenidos.

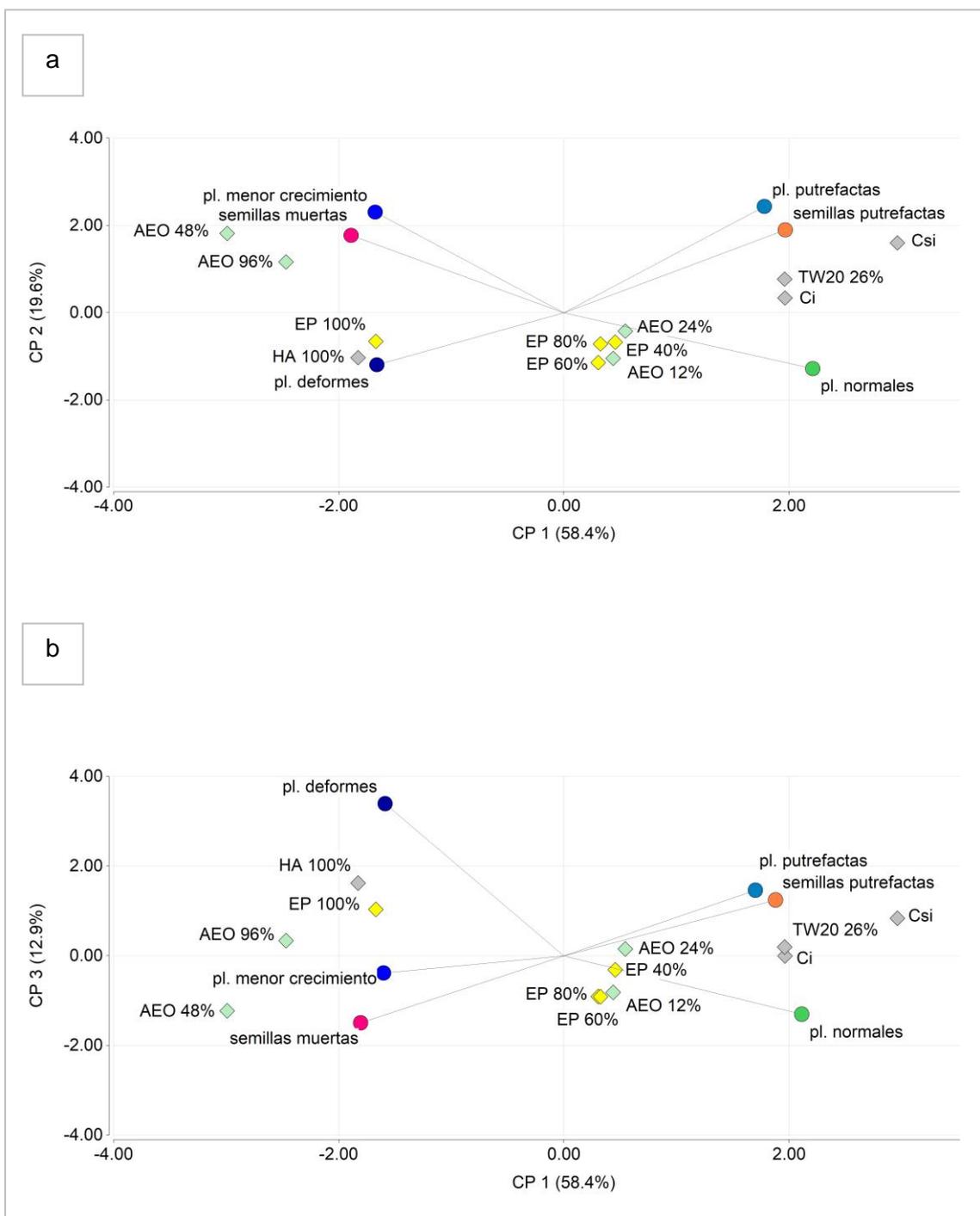


Figura 5-5. Análisis multivariado de componentes principales (CP) del segundo bioensayo realizado para evaluar la actividad fitoinhibitoria del EP y del AEO sobre la germinación de lechuga: (a) biplot de las CP1 y CP2; (b) biplot de las CP1 y CP3. En este estudio se incluyeron un control de inmersión (Ci), un control sin inmersión (Csi), un control con TW20 (Tween 20, emulsionante del AEO) y un control con HA (hidroalcohol, extractante del P).

En cuanto a los estudios sobre las propiedades fitoinhibitorias del propóleos en la germinación de la lechuga, estos son escasos y difíciles de comparar, ya que las metodologías de evaluación difieren notablemente. Gonnet (1968) postuló que el propóleos posee propiedades fitoinhibitorias por sí mismo, ya que tanto los extractos acuosos como etanólicos afectaron el crecimiento de esta especie. Por el contrario, Ordoñez *et al.* (2011) reportaron que extractos etanólicos de propóleos diluidos en el agua de riego no provocan efectos adversos en la germinación de la lechuga. Podría considerarse entonces que la formulación y forma de aplicar el propóleos determinarían sus efectos fitoinhibitorios. Si este fuera el caso, sería conveniente desolventizar parcial o totalmente el etanol presente en los extractos si se desea evitar sus efectos nocivos en las plantas a tratar.

Con respecto a los efectos de las dosis superiores de AEO, que consistieron en plántulas con menor crecimiento y deformes, y en semillas muertas, estos serían indicativos de efectos fitoinhibitorios propios de los componentes de este PNB. De acuerdo a Mirmostafae *et al.* (2020), el aceite esencial de *Origanum vulgare*, dependiendo de la dosis aplicada, inhibe la germinación de la lechuga, ya que afecta la viabilidad del embrión, o provoca una reducción del crecimiento del hipocótilo y de la radícula en sus plántulas. Aragão *et al.* (2015), observaron resultados similares a los obtenidos en este bioensayo, en semillas de lechuga expuestas a compuestos aislados de aceite esencial de *Eucalyptus* sp., tales como α -pineno, γ -terpineno y p-cimeno, los cuales se encontraban presentes en el AEO₃ utilizado en este caso (Capítulo 2). Se ha reportado, además, que los aceites esenciales generan estrés oxidativo en las semillas, lo que conduce a alteraciones en la membrana celular, a daños en las proteínas y en los núcleos celulares. Esto afecta directamente el número de divisiones celulares, de células viables y la tasa de crecimiento celular (Mutlu *et al.*, 2011; Ricci *et al.*, 2017).

Por último, y de forma análoga al primer bioensayo, los controles metodológicos, a excepción de HA 100 %, presentaron un mayor número de semillas y plántulas putrefactas. Esto contribuye a reforzar el potencial antimicrobiano de los PNB evaluados, ya que reducirían la carga microbiana asociada a las semillas y plántulas preservándolas de procesos degradativos. Esta observación, en conjunto con las anteriores, indican que concentraciones iguales o inferiores a 80 % y 24 % de EP y AEO, respectivamente, no generan efectos fitoinhibitorios sobre las semillas y plántulas de lechuga, contribuyendo además a disminuir la carga microbiana asociada a estas.

5-3.2. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la brotación de ajo

El IVD del lote de bulbillos utilizados en el estudio, que se determinó antes de tratarlos, fue de 99,25 % (Figura 5-6). De acuerdo a Burba (2013), esto indica que los propágulos de ajo se encontraban fisiológicamente aptos para ser plantados y próximos a brotar. Con respecto a los resultados del ensayo, en el conteo realizado 30 días luego de su inicio, se observaron, en promedio, más de 5 bulbillos brotados en todos los tratamientos, no difiriendo estadísticamente ($p < 0,5$) entre sí (Figura 5-7). La fenología de las plantas, en dicho momento, se correspondió a la etapa de crecimiento principal 1 (desarrollo de hojas en el brote principal) de la escala BBCH (López-Bellido *et al.*, 2016), siendo su desarrollo normal. En conjunto, estos resultados indicaron que los tratamientos no tuvieron efectos adversos sobre los bulbillos de ajo y sus plántulas, lo que constituye un resultado promisorio, ya que podrían utilizarse para proteger dichas estructuras frente a fitopatógenos.

En estudios preliminares, en los que se trataron bulbillos de ajo con dosis de hasta 100 % de EP y de HA, por 60 minutos, tampoco se observaron efectos fitoinhibitorios (Figura 5-8). Esto difiere notablemente de las observaciones del segundo bioensayo realizado con semillas de lechuga (5-3.1.), en el que las mismas concentraciones aplicadas durante un tiempo menor (2' 30"), se asociaron con alteraciones en el crecimiento y desarrollo de las plántulas (plántulas deformes). Podría considerarse que los bulbillos de ajo, al tener sus hojas verdaderas cubiertas por una hoja de protección, una gruesa hoja de reserva y una hoja de brotación (Burba, 2003), toleran la aplicación de dosis elevadas de PNB con potencial fitoinhibitorio.



Figura 5-6. Corte longitudinal de un bulbillito de ajo evidenciando un alto valor de IVD previo a realizar el ensayo.

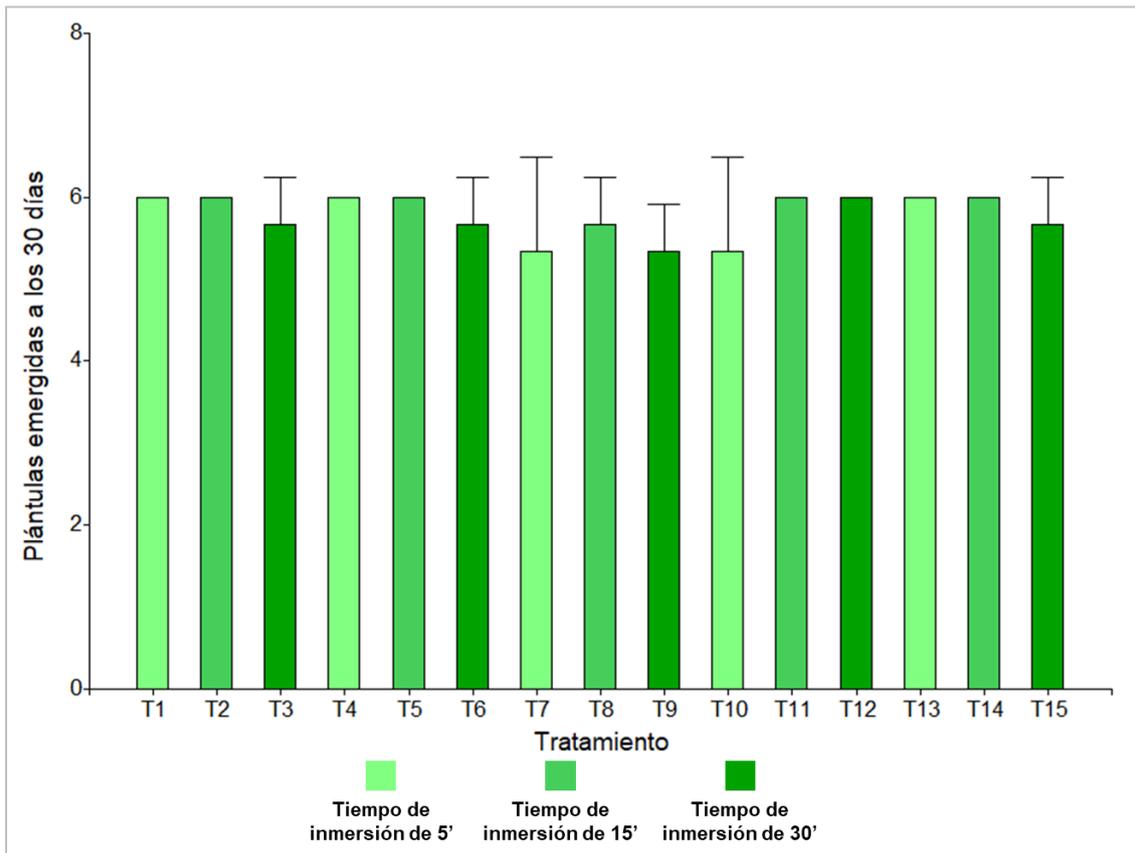


Figura 5-7. Promedios (barras coloreadas) y desvío estándar (líneas) del número de plántulas emergidas en los tratamientos aplicados a bulbillos de ajo para evaluar los efectos fitoinhibitorios del EP combinado con el AEO sobre su brotación.



Figura 5-8. Evaluación de la actividad fitoinhibitoria del EP sobre la brotación de ajo: ensayo preliminar en el cual los bulbillos brotaron sin alteraciones y las plantas crecieron y se desarrollaron normalmente con dosis de hasta EP al 100 %.

5-3.3. Actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la germinación de poroto pallares

En el estudio de la actividad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre la germinación de poroto pallares, el análisis inicial de la muestra de semillas mostró un porcentaje de viabilidad del 90 %, un PG del 86,60 % y un P1000 de 1226 g. Al tratar las semillas, se observaron cambios notables en su apariencia (Figura 5-9). En los tratamientos con EP, éstas adquirieron una coloración amarillenta, probablemente debido a pigmentos del propóleos como la crisina (Kuropatnicki *et al.*, 2013), y el tegumento seminal se tornó rugoso. Por otro lado, las semillas remojadas en soluciones con AEO presentaron una apariencia aceitosa, un fuerte olor a orégano y un tegumento seminal arrugado. Todas las semillas (incluso las del Ci), aumentaron notablemente su volumen al ser remojadas en las distintas formulaciones, lo cual fue indicativo de una fuerte imbibición (Swanson *et al.*, 1985).

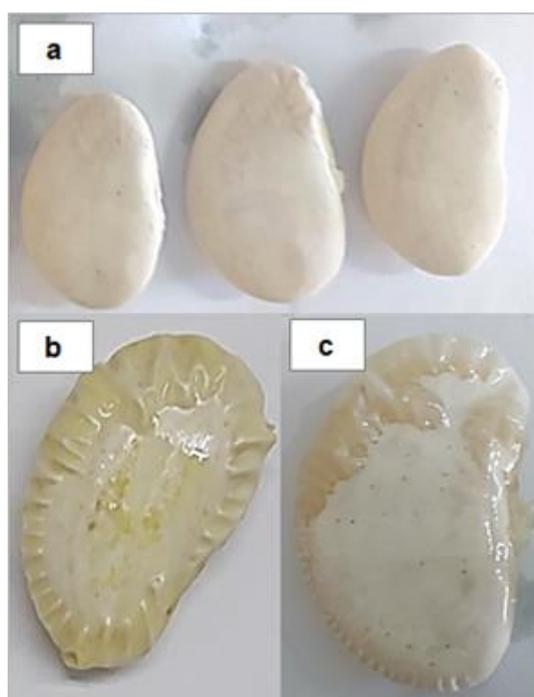


Figura 5-9. Semillas de poroto pallares tratadas por el método de inmersión durante 5' en soluciones a base de: (a) ADE (control de inmersión); (b) extracto de propóleos al 50 %; (c) aceite esencial de orégano al 12 %.

Con respecto a los resultados del ensayo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos, y en todos ellos germinó un porcentaje de semillas igual o superior al 50 %. No obstante, se observó una sutil tendencia en la que, al aumentar la dosis de EP, disminuyó el poder germinativo de las

mismas. De hecho, el EP al 50 %, junto con el HA al 50 %, mostraron los valores más bajos de este parámetro (58,3 % y 50 %, respectivamente). Esta observación sugiere la ocurrencia de cierto efecto fitoinhibitorio en la germinación del poroto, ya sea producto del HA por sí solo, o de éste y del propóleo. Por otro lado, las plantas obtenidas al finalizar el ensayo (Figura 5-10), presentaron un aspecto vigoroso, sin anomalías en su crecimiento y desarrollo, en todos los tratamientos.



Figura 5-10. Evaluación de la actividad fitoinhibitoria del EP sobre la germinación de poroto pallares. Plantas emergidas a los 30 días, con crecimiento y desarrollo normal.

En relación a los efectos de estos PNB reportados en la bibliografía, resulta interesante señalar que Semida y Rady (2014), encontraron que el extracto de propóleo desolventizado favorece la germinación del poroto común (*Phaseolus vulgaris* L.). Esto es debido a que actúa como un bioestimulante que mejora el nivel de antioxidantes, de osmoprotectores, como la prolina y los azúcares solubles, y de fitohormonas incluyendo al ácido indol-3-acético y al ácido giberélico, tanto en condiciones con y sin estrés salino. En base a esto, podría suponerse que los ligeros efectos fitoinhibitorios observados en este estudio, podrían deberse a la acción del extractante, más que a la acción del EP, pudiendo incluso este último haber aumentado la tolerancia de las semillas a dicha sustancia.

Acerca del AEO, Ascrizzi *et al.* (2021) encontraron que dosis bajas (inferiores a 1,250 g mL⁻¹) del aceite esencial de la especie aromática *Ferulago campestris*, que es

rico en α -pineno y γ -terpineno, ambos compuestos que se encontraban en AEO₂ (Capítulo 2), no afectaron la capacidad germinativa del poroto, mientras que sí lo hizo en especies arvenses. Por su parte, Lo Cantore *et al.* (2009), encontraron que la forma de aplicación, la concentración y el tiempo de exposición de semillas de poroto al eugenol, sustancia presente en los aceites esenciales de numerosas especies, como el clavo de olor, la nuez moscada y la canela, pueden afectar el poder germinativo de esta especie. Por tal motivo, estos investigadores sugirieron el desarrollo de formulaciones específicas para una mayor eficiencia, evitando los efectos negativos de este tipo de productos en las semillas.

Adicionalmente, y en referencia al estudio de la actividad fitoinhibitoria del EP y del AEO sobre la germinación de poroto pallares, cabe mencionar que se probó de manera preliminar la acción del EP al 40 % combinado con AEO al 12 %, bajo condiciones análogas a las del presente ensayo. Los resultados de esta prueba fueron alentadores, ya que germinó un porcentaje promedio de semillas de 83,3 % y las plantas presentaron un crecimiento y desarrollo normal.

5-3.4. Propiedad fitoinhibitoria del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano: un aspecto clave a evaluar en aplicaciones fitosanitarias

La aplicación de PNB para el control de fitopatógenos en semillas está sujeta a un aspecto clave: dado que poseen metabolitos secundarios asociados con actividad alelopática, pueden presentar propiedades fitoinhibitorias sobre la germinación, afectando negativamente el establecimiento de nuevas plántulas. De hecho, los aceites esenciales más efectivos en el control de plagas, suelen ser los más fitoinhibitorios, por lo que es conveniente tomar ciertas precauciones al respecto, a menos que el objetivo de su utilización sea la acción herbicida (Werrie *et al.*, 2020). Estos efectos explican cambios inducidos en las estructuras subcelulares debido, principalmente, a daño oxidativo, lo que conduce directamente a la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) (Khaliq *et al.*, 2013).

En el presente estudio, se observó que los efectos del EP y del AEO sobre propágulos hortícolas, variaron entre especies vegetales y dosis probadas. Con respecto a lo primero, Ascrizzi *et al.* (2021) y Pereira *et al.* (2021) reportaron que existen diferencias entre la sensibilidad de semillas de distintas especies a estos productos. Esto se ha relacionado, entre otras cosas, con aspectos morfológicas de los propágulos y, principalmente, con mecanismos fisiológicos de bioconversión de agentes alelopáticos en compuestos sin efectos nocivos, tales como la oxidación y reducción de terpenos por acción de deshidrogenasas y de enzimas del Citocromo P450 (Ben-Ami *et al.*, 2002). Por otro lado, y en relación a la segunda premisa, Azirak

y Karaman (2008) y Dadgostar y Nozari (2020), encontraron que los PNB suelen presentar un efecto de dosis-respuesta en sus propiedades fitoinhedoras, siendo las concentraciones superiores las que disminuyen en mayor medida la germinación.

En su revisión, Werrie *et al.* (2020) plantean que son varios los parámetros que determinan el impacto fitoinhedor de los PNB. Esto incluye, por un lado, el modo de aplicación del producto (inmersión, riego de raíces, aspersión aérea o inyección en el sistema vascular) y su formulación (dosis, coadyuvantes, etc.); por el otro, parámetros asociados a las plantas a tratar, tales como la especie, la etapa fenológica (semilla, plántula o planta madura) y el estado fisiológico. En otro sentido, y al igual que ocurre con las propiedades antimicrobianas, a menudo se estudian los efectos fitoinhedoros individuales de los constituyentes de los PNB. Sin embargo, esta propiedad resulta de la interacción entre todos los compuestos del producto, o en el caso de mezclas de productos, entre todos los componentes presentes en ella (Arminante *et al.*, 2006; De Brito *et al.*, 2021). Sin lugar a dudas, la actividad fitoinhedor de los PNB aún tiene varios aspectos por dilucidar, especialmente en cuanto a los mecanismos y modos de acción, siendo necesario continuar realizando ensayos para determinarlos.

5-4. Conclusiones

- El EP al 100 %, preparado con etanol al 70 %, inhibió la germinación y el crecimiento de plántulas de lechuga.
- El AEO tuvo efectos fitoinhedoros sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de lechuga en dosis superiores al 48 %.
- Los controles metodológicos de los solventes y/o extractantes presentes en las formulaciones fueron fundamentales al analizar los resultados. Al respecto, se encontró que el hidroalcohol (extractante del propóleos), inhibió la germinación de semillas de lechuga de igual forma que el extracto de propóleos.
- Los tratamientos con PNB evidenciaron actividad antimicrobiana en semillas de lechuga, reforzando los resultados presentados en el Capítulo 4 sobre la actividad antimicrobiana del EP y del AEO.
- Se descartó la acción fitoinhedor de numerosas formulaciones a base de extracto de propóleos y de aceite esencial de orégano sobre propágulos de ajo y de poroto pallares, resultando promisorias para realizar ensayos *in vivo* respecto de sus propiedades antifúngicas.

CAPÍTULO 6 – Actividad antimicrobiana *in vivo* del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre fitopatógenos de propágulos hortícolas

6-1. Introducción

La implantación de los cultivos es una etapa crítica en el ciclo agrícola, ya que los propágulos utilizados son vulnerables al ataque de microorganismos, especialmente de hongos fitopatógenos (Hartmann *et al.*, 1997; Rajjou *et al.*, 2012). Asimismo, las semillas (*sensu lato*) son una de las vías más importantes de diseminación de enfermedades, favoreciendo su introducción en nuevas áreas geográficas (Kumar y Gupta, 2020; Denancé y Grimault, 2022).

La mufa del ajo afecta los bulbillos durante su implantación y postcosecha (Dugan *et al.*, 2011; Gálvez y Palmero, 2021). *P. allii* sobrevive en el suelo, en residuos de cultivos anteriores, en elementos y maquinarias utilizadas para el acondicionamiento de los ajos, y en bulbos infectados. La enfermedad se establece a través de heridas, incluso en las que se generan durante la emergencia de la plántula. Las plantas infectadas crecen a un ritmo lento y son débiles, pudiendo morir. La incidencia de esta enfermedad depende de factores tales como el genotipo de ajo, las condiciones climáticas y las prácticas agronómicas durante el cultivo y postcosecha (Salinas y Cavagnaro, 2020). La forma de control de la mufa del ajo es tratar a los bulbillos, previo a la plantación, con fungicidas sintéticos de acción preventiva y/o curativa, como el procloraz, carboxim, tiram, carbendazim y benomil, mediante el método de inmersión o embarrado (Burba, 2003). En Argentina, estimaciones de FAOSTAT para la campaña 2020/21 indican que se cultivaron 15.493 hectáreas de ajo con una producción de 149.326 toneladas (SAGyP, 2023). En dicho país, *P. allii* se aisló y reportó por primera vez en 2006, y se ha estimado que ocasiona pérdidas cercanas al 15 % de la producción (Valdez *et al.*, 2006).

Por su parte, el moho blanco de los porotos causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, genera graves pérdidas productivas a nivel mundial (Schwartz y Singh, 2013; Abán *et al.*, 2019; SINAVIMO, 2022). Este fitopatógeno puede afectar varios órganos de la mencionada especie vegetal. En las semillas o plántulas recién emergidas, el ciclo de la enfermedad se inicia cuando los esclerocios presentes en el suelo germinan miceliogénicamente, y las hifas del hongo penetran en los tejidos seminales ocasionando su debilitamiento y podredumbre (Abawi y Grogan, 1979). El moho blanco también puede originarse a partir de semillas infectadas, ya que *S. sclerotiorum* es capaz de sobrevivir por un período de hasta tres años como micelio latente en la testa y en los cotiledones, afectando la calidad sanitaria y fisiológica de dichas estructuras (Tu, 1988). Todo esto, conlleva a una disminución notable del

número inicial de plantas en el cultivo. El manejo de esta enfermedad incluye la selección de lotes libres del fitopatógeno, ajustes en la densidad y la disposición del cultivo, y principalmente, el control con productos químicos sintéticos aplicados a las semillas y/o plantas (Tu, 1997; Schwartz y Singh, 2013; Abán, 2019; Teixeira *et al.*, 2019; Willbur *et al.*, 2019). La selección de cultivares resistentes podría contribuir a disminuir el uso de fungicidas; no obstante, son muy pocos aquellos que exhiben algún nivel de resistencia a esta enfermedad (Miorini *et al.*, 2019). En Argentina la producción de esta legumbre asciende a 753 mil toneladas anuales sobre una superficie de 521.713 hectáreas (MAGyP, 2021).

De lo expuesto anteriormente se destaca que el manejo de las enfermedades vegetales en la actualidad, se realiza principalmente mediante la aplicación de productos sintéticos (Wang *et al.*, 2022). En este contexto, los PNB se presentan como potenciales agentes antimicrobianos que, durante el desarrollo de biopesticidas, deben ser evaluados bajo condiciones similares a las que ocurren durante el cultivo (Lengai y Muthomi, 2018). Al respecto, este capítulo tuvo como objetivo probar *in vivo* la actividad antifúngica del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano, tanto de forma individual como combinada, frente a:

- *Penicillium allii*, agente etiológico de la mufa del ajo;
- *Sclerotinia sclerotiorum*, agente etiológico del moho blanco en semillas de poroto pallares.

6-2. Materiales y métodos

En los estudios *in vivo*, se probaron EP₁ (origen Río Colorado) y AEO₂ (origen Azul), frente a *P. allii* y *S. sclerotiorum*. Los PNB y los hongos fitopatógenos fueron caracterizados en los Capítulos 2 y 3, respectivamente.

6-2.1. Actividad antifúngica *in vivo* del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano frente a la mufa del ajo

En este estudio se utilizaron bulbillos de ajo (*Allium sativum*) del tipo colorado, aptos para la implantación del cultivo (IVD superior al 70 %, tamaño mediano y buen aspecto general). Estos fueron acondicionados, previo a comenzar la experiencia, de la siguiente manera: se desinfectaron por inmersión en etanol al 70 % (v/v) durante 4 min, y en hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) durante 20 min; se enjuagaron con ADE; y se secaron en un flujo laminar (Salinas y Cavagnaro, 2020).

El ensayo (Figura 6-1) consistió en realizar una pequeña lesión (5 mm de diámetro y 3 mm de profundidad aproximadamente) sobre el lateral convexo de cada bulbillito, utilizando un sacabocados estéril. Luego, estos se sumergieron durante 30

min en soluciones acuosas con EP y/o AEO, o en ADE en el caso de los controles (C+ y C-) (Tabla 6-1). A continuación, los bulbillos se inocularon con un disco de micelio (5 mm de diámetro) de *P. allii*, tomado de una colonia inicial, que fue colocado sobre la herida. Los dientes de ajo correspondientes al control negativo (C-), recibieron un disco de agar estéril (Gálvez y Palmero, 2021). Posteriormente, los bulbillos fueron plantados en macetas de plástico soplado (tamaño n°12), que contenían sustrato multipropósito compuesto por turba y perlita (Grow Mix Multipro, Terrafertil, Argentina). El ensayo se realizó bajo condiciones controladas de invernáculo, con riego automatizado por aspersión y temperatura entre 20 °C y 25 °C, durante 21 días.



Figura 6-1. Ensayo para evaluar *in vivo* la actividad antifúngica del EP y del AEO frente a *P. allii*: (a) lesión de bulbillos de ajo; (b) tratamiento de los bulbillos lesionados por inmersión; (c) inoculación con *Penicillium allii*; (d) ensayo bajo condiciones controladas en invernáculo.

Al finalizar, se evaluó la incidencia de la mufa del ajo, expresada como el porcentaje de plantas enfermas en cada tratamiento, y el peso seco de la biomasa aérea (PS). Asimismo, se determinó la severidad de la enfermedad, mediante una escala visual cualitativa (Figura 6-2). Se le asignó: 0, a las plantas asintomáticas con excelente aspecto general; 1, a las plantas asintomáticas con buen aspecto general; 2, a las plantas con ligeros signos y/o síntomas de la enfermedad, y aspecto general regular; 3, a las plantas con notables signos y/o síntomas de la enfermedad; 4, a los bulbillos muertos con podredumbre total. Por último, se confirmó la identidad del fitopatógeno mediante el cultivo *in vitro* de tejidos obtenidos de bulbillos con moho verde, siguiendo los procedimientos descritos en el Capítulo 3 (3-2.1.a.).



Figura 6-2. Escala visual cualitativa para evaluar la severidad de la mufa del ajo causada por *P. allii*, en bulbillos tratados con extracto de propóleos y aceite esencial de orégano. Se le asignó (0) a plantas asintomáticas con excelente aspecto general, (1) a plantas asintomáticas con buen aspecto general, (2) a plantas con ligeros signos y/o síntomas de la enfermedad y aspecto regular, (3) a plantas con notables signos y/o síntomas de la enfermedad, y (4) a los bulbillos muertos con podredumbre total.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con 15 repeticiones por tratamiento, considerando como réplicas a las macetas con un bulbillo cada una. Se realizó el ANAVA de los resultados del PS de las plantas; cuando se detectaron valores significativos de F, las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ($p < 0,05$). La fuerza de asociación entre los valores de severidad de la enfermedad y el PS de las plantas, fueron analizadas con el coeficiente de correlación de Spearman. Se utilizó el software Infostat para los mencionados análisis (Di Rienzo *et al.*, 2010).

6-2.2. Actividad antifúngica *in vivo* del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano frente al moho blanco en semillas de poroto pallares

En este estudio se utilizaron semillas de poroto pallares (*Phaseolus lunatus* var. *macrocarpus*), tomadas del mismo lote caracterizado en el Capítulo 5 (5-2.3.).

El ensayo (Figura 6-3) consistió en rellenar vasos de plástico (200 mL de capacidad) con sustrato multipropósito, compuesto por turba y perlita (Grow Mix Multipro, Terrafertil, Argentina), que se humedeció a capacidad de campo. A continuación, se dispusieron seis discos de micelio de *S. sclerotiorum* (5 mm de diámetro) en cada vaso, excepto en los correspondientes al control negativo (C-). Los vasos se incubaron en oscuridad durante 48 h a 22 ± 2 °C, y luego se sembraron semillas de poroto pallares previamente tratadas. Las mismas se sumergieron en soluciones acuosas con EP y/o AEO, o en ADE en el caso de los controles (C+ y C-), durante 5 min (Tabla 6-2). Los vasos se colocaron en una cámara de crecimiento, a 22 ± 2 °C, durante 14 días y se regaron diariamente.

Al finalizar el ensayo, se evaluó la incidencia de la enfermedad, expresada como el porcentaje de plantas enfermas en cada tratamiento, y se determinó la severidad con una escala visual cualitativa adaptada de Aysan y Demir (2009). La escala incluyó valores de 0 a 3, asignando: 0, a semillas o plántulas sanas; 1, a las plántulas con síntomas; 2, a las semillas putrefactas con escaso micelio visible; y 3, a semillas enmohecidas con abundante micelio blanco algodonoso. La identidad del fitopatógeno se confirmó mediante el cultivo *in vitro* de micelio tomado de réplicas con presencia de moho blanco, siguiendo los procedimientos del Capítulo 3 (3-2.2.).

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con cinco repeticiones por tratamiento, considerando como réplicas a las macetas con una semilla cada una. Se realizó el ANAVA de los resultados de la severidad; cuando se detectaron valores significativos de F, las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ($p < 0,05$). Se utilizó el software Infostat para los mencionados análisis (Di Rienzo *et al.*, 2010).

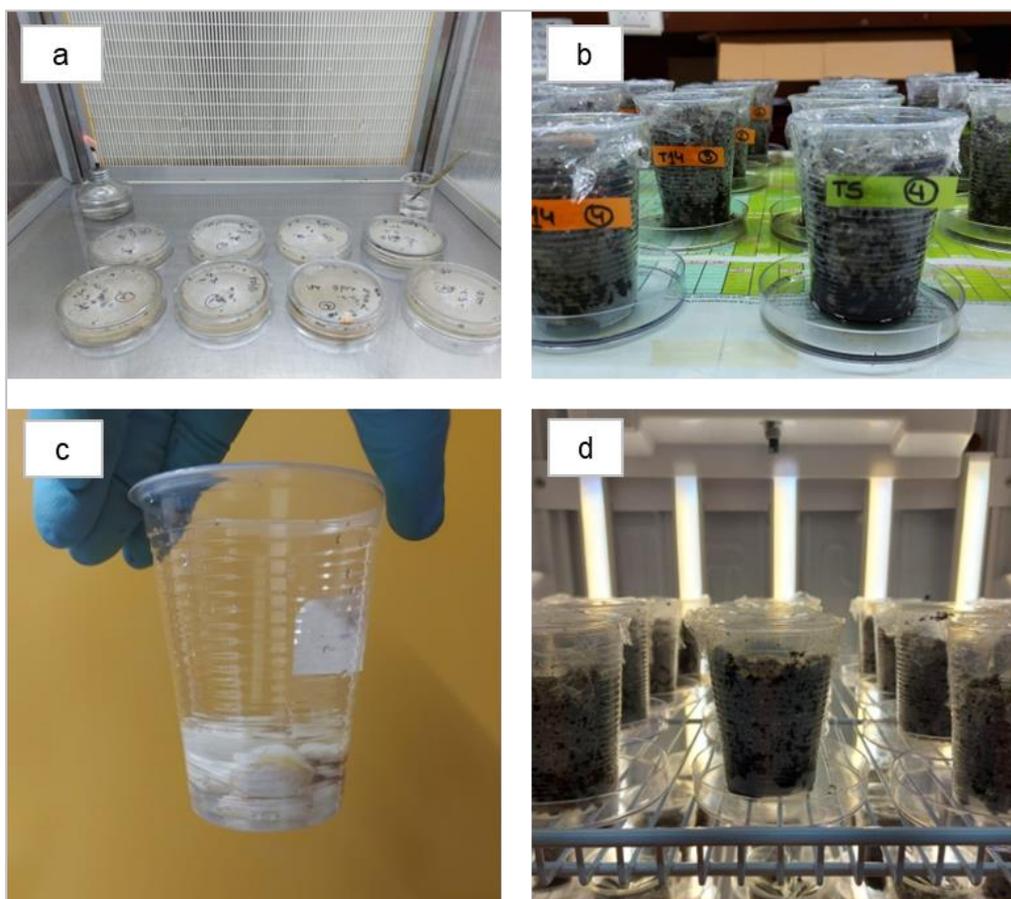


Figura 6-3. Ensayo para evaluar *in vivo* la actividad antifúngica del EP y del AEO frente a *S. sclerotiorum*: (a) colonias iniciales de *S. sclerotiorum*; (b) dispositivos en los que se incorporó el fitopatógeno y se sembraron las semillas; (c) tratamiento de semillas; (d) incubación del ensayo bajo condiciones controladas en cámara de cultivo.

6-3. Resultados y discusión

6-3.1. Actividad antifúngica *in vivo* del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano frente a la mufa del ajo

El estudio realizado para determinar *in vivo* la actividad antifúngica del EP y del AEO frente a *P. allii* (Figura 6-4), mostró una reducción en la incidencia y en la severidad de los tratamientos T2, T3 y T4, respecto del C+ (Tabla 6-1). El análisis estadístico del PS de las plantas mostró diferencias ($p < 0,05$) entre los controles metodológicos (C+ y C-), entre T4 y C+, y entre T1 y C-. De hecho, las plantas de T4 se destacaron por presentar un PS elevado y cercano al del C-. Por el contrario, T1 fue el tratamiento con plantas de menor PS, donde la incidencia y la severidad fueron equivalentes al C+. Por otro lado, el coeficiente de correlación entre los valores de severidad de la enfermedad y el PS de las plantas fue de -0,87. Esto indica una correlación negativa, es decir, una relación en sentido inverso entre las variables

evaluadas, a partir de lo que se puede inferir que a medida que aumenta la severidad de la enfermedad, disminuye el peso seco de las plantas. Con lo cual, también se demostró que la escala cualitativa utilizada para evaluar la severidad de la mufa del ajo fue adecuada. Al respecto, Cavagnaro *et al.* (2005) probaron que el incremento en la severidad de esta enfermedad causa un fuerte descenso en el peso de la materia seca de las plantas, siendo este componente del crecimiento vegetal el más afectado por la mufa del ajo. Estas observaciones también fueron explicadas por Kehr (2002), dado que *P. allii* descompone los bulbillos, afectando generalmente el tejido de la hoja de reserva. Este último es fundamental durante la brotación, ya que provee los carbohidratos necesarios para el crecimiento y el desarrollo de la nueva plántula.



Figura 6-4. Ensayo para evaluar la actividad antifúngica del EP y del AEO frente a la mufa del ajo causada por *P. allii*.

Tabla 6-1. Estudio *in vivo* sobre las propiedades antifúngicas del EP y del AEO sobre la mufa del ajo causada por *P. allii*. Se incluyeron controles con (C+) y sin inóculo (C-).

Tratamiento	PNB ^a	Incidencia (%)	Severidad	PS (g) ^b
T1	10 % EP	46	1,53 ± 0,99 ^c	0,33 ± 0,14 a ^d
T2	1,2 % AEO	20	0,93 ± 1,09	0,46 ± 0,18 bc
T3	10 % EP + 1,2 % AEO	20	0,86 ± 0,91	0,43 ± 0,14 abc
T4	5 % EP + 0,6 % AEO	0	0,6 ± 0,50	0,49 ± 0,17 c
C+	-	46	1,33 ± 1,11	0,36 ± 0,14 ab
C-	-	0	0,46 ± 0,74	0,50 ± 0,12 c

^a Concentración de los productos naturales bioactivos en la solución acuosa.

^b Peso seco de la biomasa aérea.

^c Cada dato es el promedio de 15 repeticiones ± desvío estándar.

^d Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba LSD de Fisher.

Los resultados de este ensayo mostraron cierta concordancia con los estudios realizados *in vitro* para el mismo fitopatógeno (Capítulo 4). El AEO presentó mayor efecto antifúngico que el EP, lo cual refuerza el supuesto de que *P. allii* es más susceptible a los compuestos bioactivos del primero (monoterpenos), que del segundo (fenoles). Asimismo, la mezcla de ambos productos en dosis reducidas (T4) resultó promisorio, al disminuir considerablemente las cantidades de EP y de AEO necesarias para prevenir la enfermedad. Cabe mencionar que la combinación de distintos PNB permite no solo aumentar la eficacia antifúngica de cada uno, sino también combinar diferentes mecanismos y modos de acción, lo que evita el desarrollo de resistencia a los tratamientos en los fitopatógenos (Chanda y Rakholiya, 2011).

La ausencia de actividad antifúngica individual en el tratamiento con EP podría deberse, en una primera instancia, a que la concentración utilizada fue inferior a la necesaria para inhibir *in vivo* al fitopatógeno, ya que el efecto de este producto es altamente dependiente de la dosis (Da Silva *et al.*, 2006), tal como se observó en el Capítulo 4 de esta tesis. Por otro lado, es también probable que la acción antifúngica del propóleo haya sido afectada por las condiciones *in vivo*. Al respecto, los compuestos fenólicos presentes en este producto, son sensibles a factores tales como el pH, la luz y el oxígeno del medio ambiente (Jia *et al.*, 2016). Formulaciones más complejas de este producto podrían mejorar su biodisponibilidad y efectividad *in vivo*, tal como demostraron en sus estudios Drago *et al.* (2007) y Sosa *et al.* (2007). Estos investigadores probaron que el propóleo actiquelado (Actichelated® propolis), posee una acción antifúngica significativamente superior a la del extracto de propóleo por sí

solo. La tecnología de producción comprende un proceso mecánico y uno químico que incorporan a este producto un portador, un biocatalizador y un agente quelante.

Los estudios referidos a la acción antimicrobiana *in vivo* del EP y del AEO sobre especies del género *Penicillium* son escasos, pero alentadores. Con respecto al primero, Pereira *et al.* (2022) reportaron que el extracto hidroalcohólico de propóleos redujo en un 66,5 % el tamaño de las lesiones causadas por *P. expansum* en frutos de manzana, sin causar efectos adversos sobre el tejido vegetal. Con respecto al segundo, Pérez-Alfonso *et al.* (2012) demostraron que el timol y el carvacrol, ambos compuestos típicamente presentes en el AEO, fueron altamente efectivos para control *P. digitatum* y *P. italicum* en frutos de limón. También, según estos autores, el agregado de ceras a las mencionadas sustancias contribuyó a optimizar sus propiedades, lo que refuerza que la formulación influye notablemente en la efectividad de este tipo de productos, siendo necesario avanzar en tal sentido a futuro.

6-3.2. Actividad antifúngica *in vivo* del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano frente al moho blanco en semillas de poroto pallares

Los resultados del estudio *in vivo* realizado para evaluar la acción antifúngica del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano frente a *S. sclerotiorum*, se muestran en la Tabla 6-2 y en la Figura 6-5. Se determinó que la mezcla de ambos productos (T3 y T4), redujo la incidencia y la severidad de la enfermedad significativamente ($p < 0,05$) respecto del C+. Asimismo, y de forma análoga a lo observado en el estudio *in vivo* con *P. allii*, la combinación del EP y del AEO en bajas dosis (T4) presentó valores de severidad estadísticamente similares a los del C-. Estos resultados contribuyen a reforzar el potencial antimicrobiano que tienen las mezclas de diferentes PNB, discutido en el Capítulo 4 de esta tesis en base a estudios *in vitro*.

Los tratamientos individuales a base de EP y de AEO carecieron de efectos significativos frente a *S. sclerotiorum*; sin embargo, su aplicación ocasionó cierta disminución en el crecimiento visible del hongo. Al respecto, se observó que en T1 y en T2 el micelio presente sobre las semillas y el sustrato fue menos denso que en el C+. En los estudios *in vitro* realizados en el Capítulo 4 frente a este fitopatógeno (4-3.2.), tanto el EP como el AEO inhibieron significativamente su crecimiento. La diferencia sustancial entre los resultados de ambas experiencias (*in vitro* versus *in vivo*), podría deberse a que en el patosistema hubo mayor degradación y volatilización de los componentes bioactivos de los productos que en las placas de Petri. Tal como han descrito otros investigadores, la exposición de compuestos fenólicos y de terpenos a la humedad, oxígeno, y otros agentes presentes en medio *in vivo*, puede ocasionar la degradación de estas moléculas, disminuyendo la eficacia de sus

propiedades (Jia *et al.*, 2016; Chouhan *et al.*, 2017). En este sentido, Ferreira Borges *et al.* (2018) destacan la importancia de avanzar en el desarrollo de formulaciones más complejas de los PNB, que permitan una liberación controlada de sus componentes bioactivos, a la vez que éstos son protegidos de las condiciones desfavorables imperantes a campo.

Tabla 6-2. Estudio *in vivo* sobre las propiedades antifúngicas del extracto de propóleos (EP₁) y del aceite esencial de orégano (AEO₂), sobre la podredumbre blanca causada por *S. sclerotiorum* en semillas de poroto pallares (*P. lunatus*). Se incluyeron un control positivo con inóculo (C+) y un control negativo sin inóculo (C-).

Tratamiento	PNB ^a	Incidencia (%)	Severidad
T1	40 % EP	100	2,6 ± 0,55 ^{b ab^c}
T2	12 % AEO	100	1,8 ± 0,84 bc
T3	40 % EP + 12 % AEO	60	1,2 ± 1,1 cd
T4	20 % EP + 6 % AEO	40	0,8 ± 1,1 de
C+	-	100	3 ± 0 a
C-	-	0	0 ± 0 e

^a Concentración de los PNB en la solución acuosa.

^b Cada dato es el promedio de 5 repeticiones ± desvío estándar.

^c Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba LSD de Fisher.

Por otro lado, al finalizar el ensayo, se encontraron, en todos los tratamientos, algunas pocas semillas sin germinar y plántulas con bajo vigor, probablemente debido a cuestiones fisiológicas propias de las semillas, o a ligeros efectos fitoinhibitorios de los tratamientos a base de los PNB. Es destacable que en los tratamientos T3 y T4, estas unidades no presentaban signos y síntomas de la enfermedad, a diferencia de lo que ocurrió en C+. En base a estos resultados, se puede afirmar que los PNB evaluados reducen la carga microbiana asociada a semillas y plántulas.

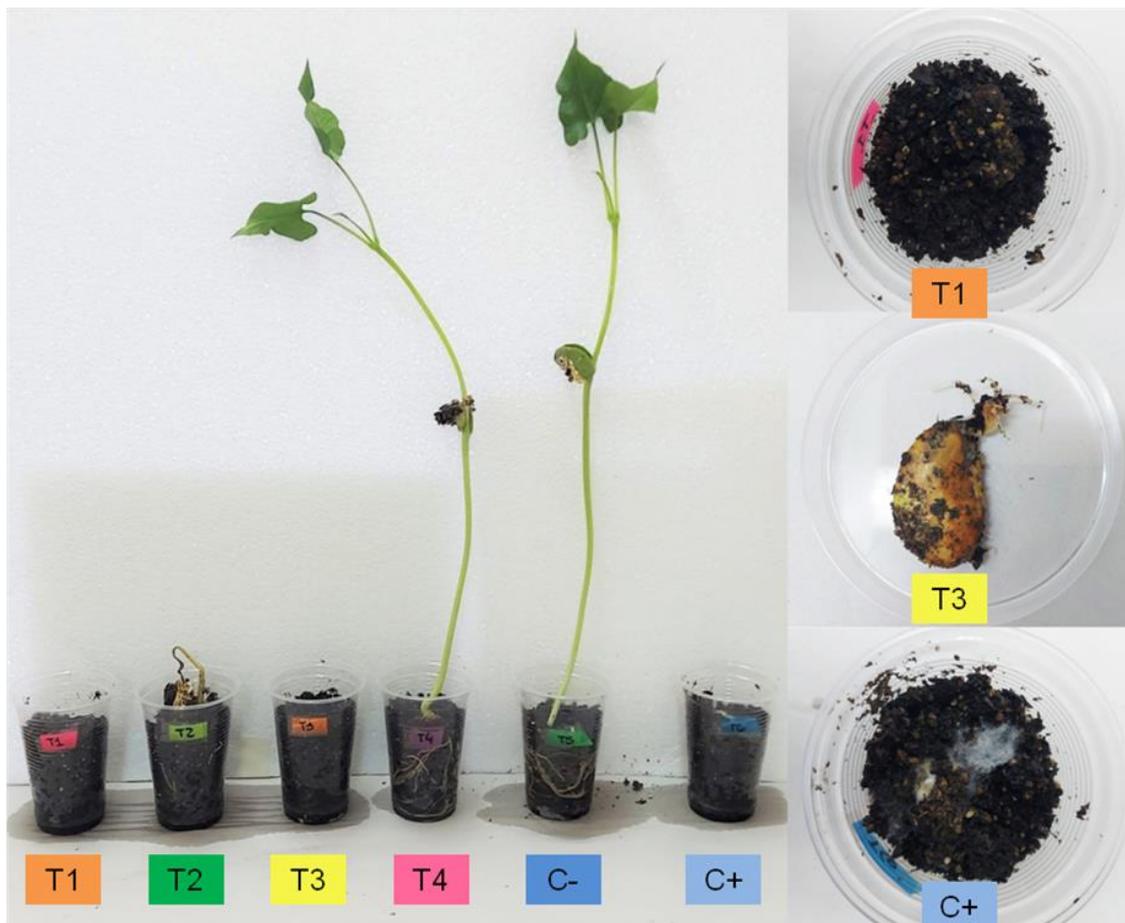


Figura 6-5. Estudio *in vivo* de las propiedades antifúngicas del extracto de propóleos (EP₁) y del aceite esencial de orégano (AEO₂), sobre la podredumbre blanca causada por *S. sclerotiorum* en semillas de poroto pallares (*P. lunatus*). Se incluyeron un control positivo con inóculo (C+) y un control negativo sin inóculo (C-). Las imágenes de la derecha muestran: (T1) semilla tratada con EP sobre la que se desarrolló escaso micelio de *S. sclerotiorum*, (T3) semilla germinada asintomática y (C+) semilla con abundante micelio algodonoso.

Existen pocos estudios *in vivo* sobre la aplicación de extracto de propóleos o aceites esenciales en cultivos de interés agronómico, con el fin de controlar de manera sustentable al fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Con respecto al primero, Matny *et al.* (2014) observaron que el extracto etanólico de propóleos al 2 y 5 % protegió durante cuatro semanas a vainas de poroto inoculadas con este fitopatógeno, que fueron tratadas por inmersión en dichas soluciones durante un minuto. Estos tratamientos lograron reducir significativamente la severidad de la enfermedad durante todo el ensayo.

En cuanto al segundo PNB, Soylu *et al.* (2007) probaron que el agregado de aceite esencial de orégano al suelo, reduce la viabilidad de los esclerocios de *S. sclerotiorum* presentes en el mismo, e inhibe el crecimiento micelial de este hongo, lo que permite un aumento significativo de la supervivencia de plantines de tomate

respecto de aquellos que crecen en suelos sin tratar. Por su parte, Hassanin *et al.* (2017) determinaron que el aceite esencial de tomillo, el cual presenta compuestos bioactivos de la misma familia que el orégano, disminuyó notablemente la severidad de *S. sclerotiorum* en propágulos de hinojo. En este estudio, los investigadores trataron a las semillas por inmersión durante 15' en soluciones a base del aceite nanoemulsionado, y luego las sembraron sobre sustrato infectado con el fitopatógeno, de forma similar a lo realizado en este ensayo. De acuerdo a estos autores, la formulación de los productos naturales influye notablemente en sus propiedades antifúngicas. Esto es clave, ya que, tal como se mencionó anteriormente resulta fundamental mejorar la biodisponibilidad del EP y del AEO para alcanzar una mayor eficiencia, similar a la obtenida en estudios *in vitro*.

6-3.3. Perspectivas sobre la aplicación del extracto de propóleos y el aceite esencial de orégano para la protección de propágulos frente a fitopatógenos

Actualmente el control de la mayoría de las enfermedades que afectan a los propágulos hortícolas se realiza mediante la aplicación de productos sintéticos (Nazarov *et al.*, 2020). Sin embargo, esta estrategia no es apta en planteos orgánicos (Jiménez-Reyes *et al.*, 2019) y se asocia a efectos indeseables sobre la salud humana (Singh *et al.*, 2018) y el medioambiente (EPA, 2010). Asimismo, se han reportado numerosos casos de resistencia a los fungicidas tradicionalmente utilizados (Vallad y Goodman, 2004; FRAC, 2019), como por ejemplo en especies del género *Penicillium* al benomilo (también conocido como Benomil o Benomy) (Brammall, 1989), lo que podría poner en riesgo la eficacia de éstos en un futuro (Samaras *et al.*, 2020). Por tal motivo, resulta de interés evaluar alternativas que permitan prevenir, controlar y/o erradicar a las enfermedades de manera sustentable, como, por ejemplo, con los PNB.

En este contexto, la mayoría de los trabajos referidos a biopesticidas se concentran en la actividad antimicrobiana *in vitro* de productos naturales. Gracias a ellos se ha demostrado el alto potencial de diversos extractos y de aceites esenciales frente a fitopatógenos. Sin embargo, los resultados prometedores obtenidos en laboratorio, por lo general difieren de aquellos obtenidos *in vivo*, registrando en esta etapa una menor eficiencia de los PNB, tal como ocurrió en esta tesis. Esto se ha asociado a que las condiciones del medio, tales como la humedad, el oxígeno y el pH, favorecen la degradación de los componentes bioactivos de los productos naturales (Jia *et al.*, 2016). En el caso de los aceites esenciales, la volatilización de sus componentes ha sido citada como la principal causa de la disminución de su efectividad en sistemas agrícolas (Raveau *et al.*, 2020). Esto plantea desafíos

relacionados con la vía de aplicación y la formulación de los PNB para ser utilizados como tratamientos sanitarios en semillas. Como es bien sabido, durante el cultivo de las especies hortícolas en los sistemas agrícolas intervienen factores climáticos, edáficos, bióticos, de manejo, entre otros, que, de forma análoga a los estudios *in vivo*, seguramente afecten su eficacia.

En la revisión realizada por Rocha *et al.* (2019), se señala que la técnica conocida como “recubrimiento de semillas” (en inglés “seed coating”), es una alternativa eficiente para agregar tratamientos antifúngicos a base de PNB a dichas estructuras vegetales. Esta tecnología consiste en formar una capa continua sobre la superficie de las semillas, utilizando materiales exógenos que contienen, disueltos en su formulación o suspendidos, los principios activos de interés. Generalmente, en las mezclas se agregan aglutinantes, estabilizantes y antioxidantes, que permiten la adherencia y la disponibilidad uniforme y prolongada de los PNB. Asimismo, la aplicación de polvos secos (“dry coating”), de suspensiones líquidas (“seed dressing”) y de finas películas protectoras (“film coating”) a las semillas, así como el incrustado y el pelletizado de las mismas, son variantes de recubrimiento que podrían ser utilizadas con el mismo fin (Sharma *et al.*, 2015; Afzal *et al.*, 2020). Por otro lado, se ha propuesto utilizar potenciadores de la actividad antimicrobiana en la formulación de los PNB, lo que aumentaría considerablemente su eficacia. Esto incluye el uso de nanomateriales a base de lípidos, polímeros, metales y productos naturales, como el quitosán (o quitosano) (Ferreira Borges *et al.*, 2018; Skwarczynski *et al.*, 2022).

De manera que es posible considerar el uso del EP y del AEO como estrategias sustentables para el control de enfermedades en semillas causadas por fitopatógenos de importancia agrícola tales como *Penicillium* sp. y *Sclerotinia* sp. Serán necesarios nuevos estudios respecto de la formulación y forma de aplicación de los mismos, para aumentar su eficacia y continuar avanzando en el desarrollo de biofungicidas para uso agrícola.

6-4. Conclusiones

- El extracto de propóleos y el aceite esencial de orégano, aplicados de forma individual, carecieron de actividad antifúngica *in vivo* sobre *P. allii* y *S. sclerotiorum*.
- La combinación de extracto de propóleos con aceite esencial de orégano, disminuyó la incidencia y la severidad de la mufa del ajo causada por *P. allii*, y del moho blanco causado por *S. sclerotiorum* en semillas de poroto pallares.
- Los resultados obtenidos demostraron el potencial antifúngico que posee la mezcla de ambos PNB para el tratamiento de enfermedades en las semillas.

- La acción antifúngica de los PNB podría mejorarse mediante la formulación y la técnica de aplicación, en pos de lograr alternativas sustentables altamente efectivas para el control de fitopatógenos en semillas.

CAPÍTULO 7 – Consideraciones finales

Las etapas de evaluación del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano llevadas a cabo en esta tesis, permitieron determinar sus potenciales como tratamientos antifúngicos para propágulos hortícolas (Figura 7-1). Al respecto, durante la bioprospección, se comprobó que, a pesar de las diferencias existentes entre las características físicas y químicas de las muestras analizadas, todas ellas presentaron una abundante cantidad de metabolitos secundarios vegetales con potencial bioactivo. Estos pertenecieron al grupo de los fenoles en los extractos de propóleos y al grupo de los terpenos en los aceites esenciales de orégano. De esta forma, ambos tipos de productos se consideraron promisorios para ser evaluados respecto de sus propiedades antimicrobianas y fitoinhedoras.

En los ensayos *in vitro*, realizados durante el cribado en laboratorio, el extracto de propóleos y el aceite esencial de orégano fueron efectivos en el control de los fitopatógenos *Penicillium allii* y *Sclerotinia sclerotiorum*, y mostraron diferencias en su efectividad y forma de actuar. Asimismo, al combinar ambos productos, se observaron efectos antifúngicos aditivos y sinérgicos, que muy probablemente se debieron a la conjunción de los modos y mecanismos de acción de las diversas moléculas bioactivas presentes en la mezcla. En esta instancia, también se comprobó el potencial antibacteriano del extracto de propóleos frente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas gardneri* y *X. vesicatoria*.

Por otro lado, en la primera etapa de los ensayos *in vivo*, se observó que ambos productos tuvieron efectos fitoinhedoros sobre semillas hortícolas (*sensu lato*). Esto se asoció a los metabolitos secundarios que contienen y, en el caso puntual del propóleos, a la acción de su extractante (etanol al 70 %). Cabe mencionar que la acción del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano sobre los propágulos hortícolas analizados, dependió de la dosis aplicada y de las estructuras morfológicas estudiadas en cada especie. Esta instancia de evaluación resultó clave para seleccionar tratamientos sin efectos adversos sobre la calidad fisiológica de bulbillos de ajo y semillas de poroto pallares, que luego fueron probados *in vivo* respecto de sus propiedades antifúngicas.

En la última parte de este trabajo, tal como se mencionó anteriormente, se probó que ciertas formulaciones de extracto de propóleos combinado con aceite esencial de orégano, disminuyeron la incidencia y la severidad de la mufa del ajo causada por *P. allii*, y del moho blanco causado por *S. sclerotiorum* en semillas de

poroto pallares. Esto permitió destacar la acción antifúngica sinérgica de ambos productos. Sin embargo, los efectos observados *in vivo* sobre los fitopatógenos fueron menores que en los ensayos *in vitro*. Muy probablemente, las condiciones del medio de los patosistemas influyeron negativamente en la bioactividad de los compuestos que contienen. De esta forma, quedó en evidencia la necesidad de desarrollar formulaciones más complejas que las utilizadas en estos estudios, y/o de emplear otras formas de aplicación, como podría ser el pelletizado de las semillas, ya que en los sistemas agrícolas las condiciones ambientales y las prácticas de manejo modificarán aún más la efectividad de estos PNB a campo.

Considerando todos los resultados obtenidos, se acepta la hipótesis planteada al inicio de esta tesis respecto de que el extracto de propóleos y el aceite esencial de orégano contienen metabolitos secundarios vegetales, presentan actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos y tienen efectos fitoinhbitorios sobre propágulos hortícolas. A su vez, se puede afirmar que las características de estos productos son variables y complejas, existiendo numerosos factores que determinan su composición química. Dado que esto último influye directamente en sus propiedades bioactivas, es fundamental realizar un estudio detallado de los mismos, siguiendo un esquema de trabajo integrador y empleando técnicas analíticas estandarizadas.

A futuro, y en base a las premisas planteadas en este trabajo, será necesario continuar investigando sobre la posible utilización del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano como biofungicidas. Puntualmente, se sugiere avanzar en el estudio de:

- los modos y mecanismos de acción que subyacen a sus propiedades antimicrobianas, que actualmente no se han terminado de dilucidar y resultan de interés para comprender el porqué de sus efectos;
- la actividad fitoinhbitoria, ya que constituye una posible restricción a su aplicación sobre las semillas;
- el desarrollo de formulaciones y de formas de aplicación, que permitan lograr una mayor biodisponibilidad y eficiencia *in vivo* y a campo;
- el impacto de su aplicación sobre el ecosistema, ya que, a pesar de ser considerados extremadamente seguros, para su registro y aplicación será necesario contar con estudios específicos al respecto.

Para finalizar, se destaca que esta tesis aporta información novedosa sobre las características y propiedades del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano. De hecho, los resultados obtenidos constituyeron el primer reporte sobre la acción antifúngica sinérgica que se logra al combinarlos. Sin dudas, ambos productos

resultaron promisorios para proteger a las semillas hortícolas frente a fitopatógenos. Continuar con investigaciones en esta temática permitirá desarrollar alternativas sustentables para la producción vegetal y agregar valor en origen a la producción de propóleos y de especies aromáticas.



Figura 7-1. Estudio del extracto de propóleos y del aceite esencial de orégano para determinar su potencial como tratamientos sanitarios para propágulos hortícolas.

BIBLIOGRAFÍA

Abán, C. L. (2019). *Variabilidad fenotípica y genotípica de aislamientos de Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, agente causal de la esclerotinia del poroto en el NOA*. [Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional De Salta].

https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/80192/CONICET_Digital_Nro.aa14366_a-96ff-4373-a736-0c98ef520bf6_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Abawi, G. S., y Grogan, R. G. (1979). Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69(8), 899-904.

Abbey, L., Abbey, J., Leke-Aladekoba, A., Iheshiulo, E. M. A., y Ijenyo, M. (2019). Biopesticides and biofertilizers: types, production, benefits, and utilization. *Byproducts from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels*, 479-500.

Abd-El-Kareem, F., Abd-Elgawad, M. M. M., y Saied, N. (2017). Postharvest application with propolis for controlling white rot disease of green bean pods. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 310-314.

Adams, P. B., y Ayers, W. A. (1979). Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69(8), 896-899.

Adorjan, B., y Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407-426. <https://doi.org/10.1002/ffj.2024>

Afzal, I., Javed, T., Amirkhani, M., y Taylor, A. G. (2020). Modern seed technology: Seed coating delivery systems for enhancing seed and crop performance. *Agriculture*, 10(11), 526. <https://doi.org/10.3390/agriculture10110526>

Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier.

Akualing, J. S., y Rejeki, I. P. S. (2018). ANTIBIOGRAM (Antibiogram). *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 23(1), 90-95.

Alekseeva, M., Zagorcheva, T., Atanassov, I., y Rusanov, K. (2020). *Origanum vulgare* L. - a review on genetic diversity, cultivation, biological activities, and perspectives for molecular breeding. *Bulg. J. Agric. Sci*, 26, 1183-1197.

Ali, A., Chow, W. L., Zahid, N., y Ong, M. K. (2014). Efficacy of propolis and cinnamon oil coating in controlling post-harvest anthracnose and quality of chilli (*Capsicum annuum* L.) during cold storage. *Food and Bioprocess Technology*, 7(9), 2742-2748. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1237-y>

Almuhayawi, M. S. (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi journal of biological sciences*, 27(11), 3079-3086. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.016>

Alonso-Gato, M., Astray, G., Mejuto, J. C., y Simal-Gandara, J. (2021). Essential oils as antimicrobials in crop protection. *Antibiotics*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010034>

Álvarez, S. (2012). Caracterización organoléptica y físico-química de propóleos del departamento de La Libertad, Perú. *The Biologist*, 10(1), 34-40.

Angulo Vaca, J. B. (2014). *Caracterización y actividad antioxidante de propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de Chimborazo utilizados en la empresa Apicare-Riobamba*. [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica De Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3188>

Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., ... y Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1695-1703. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>

Antolak, H., y Kregiel, D. (2017). Food preservatives from plants. *Food additives*, 45-85. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70090>

Anupama, G., Das, K. K., y Avinash, M. (2019). Essential oils: A novel source for food preservation. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1), 2098-2101.

Aragão, F. B., Palmieri, M. J., Ferreira, A., Costa, A. V., Queiroz, V. T., Pinheiro, P. F., y Andrade-Vieira, L. F. (2015). Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopathy Journal*, 35(2), 259-272.

Arauz, L. F. (1998). *Fitopatología: un enfoque agroecológico*. Universidad de Costa Rica.

Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., y González de Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.

Arminante, F., De Falco, E., De Feo, V., De Martino, L., Mancini, E., y Quaranta, E. (2006, February). Allelopathic activity of essential oils from Mediterranean Labiatae. In *I International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation* 723.

Ascrizzi, R., Flamini, G., Bedini, S., Tani, C., Giannotti, P., Lombardi, T., ... y Fraternali, D. (2021). *Ferulago campestris* Essential Oil as Active Ingredient in Chitosan Seed-Coating: Chemical Analyses, Allelopathic Effects, and Protective Activity against the Common Bean Pest *Acanthoscelides obtectus*. *Agronomy*, 11(8), 1578. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081578>

Asensio, C. M., Grosso, N. R., y Juliani, H. R. (2015). Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.) essential oils

from central and southern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 63, 203-213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.056>

Aysan, E., y Demir, S. (2009). Using arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosarum*, Biovar phaseoli Against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de bary in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Pathology Journal*, 8, 74-78.

Azcón-Bieto, J., y Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana.

Azirak, S., y Karaman, S. (2008). Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 58(1), 88-92. <https://doi.org/10.1080/09064710701228353>

Aziz, A., Yuliawan, V. N., y Kustiawan, P. M. (2021). Identification of Secondary Metabolites and Antibacterial Activity of Non Polar Fraction from Heterotrigonaitama Propolis. *Journal of Fundamental and Applied Pharmaceutical Science*, 2(1), 23-33. <https://doi.org/10.18196/ifaaps.v2i1.12406>

Baleix J. G. 2014. *Propiedades antifúngicas del propóleos sobre Penicillium sp. patógeno del cultivo de ajo*. Tesina de grado, Universidad Nacional del Sur.

Balouiri, M., Sadiki, M., y Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Bankova, V. (2005a). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>

Bankova, V. (2005b). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 29-32. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh059>

Bankova, V. (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(2), 23-28. <https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.2.01>

Bankova, V. S., de Castro, S. L., y Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.

Bankova, V., Popova, M., y Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, 2, 8-28. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-28>

Bankova, V., y Marcucci, M. C. (2000). Standardization of propolis: present status and perspectives. *Bee World*, 81(4), 182-188. <http://dx.doi.org/10.1080/0005772X.2000.11099492>

Barra, A. (2009). Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Natural product communications*, 4(8), 1934578X0900400827. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400827>

Bedascarrasbure E, Maldonado L, Fierro Morales W, Álvarez A. (2006). *Propóleos*. Editorial Magna.

Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., y Rodríguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23, 369-372.

Ben-Ami, M., Chaimovich, R., Chaimovitch, D., & Dudai, N. (2002, August). Essential oils as allelopathic agents: bioconversion of monoterpenes by germinating wheat seeds. In *XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants* 629.

Bolton, M. D., Thomma, B. P., y Nelson, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 7(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2005.00316.X>

Bonvehí, J. S., y Coll, F. V. (2000). Study on propolis quality from China and Uruguay. *Zeitschrift für Naturforschung*, 55(9-10), 778-784. <https://doi.org/10.1515/znc-2000-9-1017>

Bouaziz, M., Yangui, T., Sayadi, S., y Dhouib, A. (2009). Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 47(11), 2755-2760. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.08.005>

Bouyahya, A., Dakka, N., Talbaoui, A., Et-Touys, A., El-Boury, H., Abrini, J., y Bakri, Y. (2017). Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum* Benth). *Industrial crops and products*, 108, 729-737. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.033>

Brammall, R. A. (1989). Resistance to benomyl in isolates of *Penicillium* sp. causing clove decay of garlic. *Canadian journal of plant pathology*, 11(4), 409-414.

Burba, J. L. (2003). *Producción de ajo*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Burba, J.L. (2013). *Manual de Procedimientos Operativos para la Producción, Empaque, Comercialización e Industrialización de Ajo*. INTA Estación Experimental La Consulta.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

- Castaño Zapata, J. (2015). *Principios básicos de hongos fitopatógenos*. Universidad de Caldas.
- Catara, V., Sutra, L., Morineau, A., Achouak, W., Christen, R., y Gardan, L. (2002). Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(5), 1749-1758.
- Cavagnaro, P. F., Camargo, A., Piccolo, R. J., Lampasona, S. G., Burba, J. L., y Masuelli, R. W. (2005). Resistance to *Penicillium hirsutum* Dierckx in garlic accessions. *European Journal of Plant Pathology*, 112(2), 195-199. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-1750-6>
- Chaillou, L. L., y Nazareno, M. A. (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT-Food Science and Technology*, 42(8), 1422-1427. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.002>
- Chanda, S., y Rakholiya, K. (2011). Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. *Microbiology Book Series*, 1, 520-529.
- Chang, R. J., Ries, S. M., y Pataky, J. K. (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81(10), 1276-1281.
- Chaudhary, S., Lal, M., Sagar, S., Tyagi, H., Kumar, M., Sharma, S., y Chakrabarti, S. K. (2020). Genetic diversity studies based on morpho-pathological and molecular variability of the *Sclerotinia sclerotiorum* population infecting potato (*Solanum tuberosum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 1-15.
- Chimshirova, R., Popova, M., Chakir, A., Valcheva, V., Dimitrov, S., Trusheva, B., ... y Bankova, V. (2022). Antimicrobial triterpenoids and ingol diterpenes from propolis of semi-arid region of Morocco. *Molecules*, 27(7), 2206. <https://doi.org/10.3390/molecules27072206>
- Chishti, S., Kaloo, Z. A., y Sultan, P. (2013). Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5(10), 170-177. <https://doi.org/10.5897/JPP2013.0285>
- Choi, Y. M., Noh, D. O., Cho, S. Y., Suh, H. J., Kim, K. M., y Kim, J. M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 39(7), 756-761. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.05.015>
- Chouhan, S., Sharma, K., y Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>

Ciancaglini, L. N. (2020). *Producción orgánica en distintas condiciones edáficas de orégano europeo (Origanum vulgare) cv. Alpa Sumaj irrigado con aguas residuales de la industria frigorífica en la localidad de Cabildo*. Tesina de grado, Universidad Nacional del Sur.

Cibanal I. L., Fernández L. A., Krepper G., Pellegrini C. N., Gallez L. M. (2019). Avances en el desarrollo de un biofungicida: caracterización físico-química y actividad antifúngica de propóleos. *Agrociencia Uruguay*, 23(2), 1-10. <https://doi.org/10.31285/AGRO.23.83>

Cibanal, I. L., Fernandez, L. A., Murray, A. P., Pellegrini, C. N., y Gallez, L. M. (2021). Propolis extract and oregano essential oil as biofungicides for garlic seed cloves: *in vitro* assays and synergistic interaction against *Penicillium allii*. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1909-1918. <https://doi.org/10.1111/jam.15081>

Cibanal, I.L., Fernández, L. A., Rodríguez, S. A., Pellegrini, C. N., y Gallez, L. M. (2022). Propolis extract combined with oregano essential oil applied to lima bean seeds against *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02536-4>

Cole, S. E., LaRiviere, F. J., Merrih, C. N., y Moore, M. J. (2009). A convergence of rRNA and mRNA quality control pathways revealed by mechanistic analysis of nonfunctional rRNA decay. *Molecular cell*, 34(4), 440-450. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.017>

Copping, L. G., y Menn, J. J. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56(8), 651-676.

Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J., y Degenhardt, J. (2010). Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant molecular biology*, 73(6), 587-603. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9636-1>

Cui, H., Zhang, C., Li, C., y Lin, L. (2019). Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crops and Products*, 139, 111498. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111498>

Da Silva Frozza, C. O., García, C. S. C., Gambato, G., de Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., ... y Roesch-Ely, M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and chemical toxicology*, 52, 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013>

Da Silva, J. F. M., de Souza, M. C., Matta, S. R., de Andrade, M. R., y Vidal, F. V. N. (2006). Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 99(3), 431-435. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.055>

Dadgostar, S., y Nozari, J. (2020). Evaluation of propolis extract in preventing weed seed germination. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 10(4), 125-130.

Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2576-2581. <https://doi.org/10.1021/jf990835x>

Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Lucini, E. I., Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P. J., y Zygadlo, J. A. (2010). Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), 1115-1120. <https://doi.org/10.1021/jf903203n>

De Brito, V. D., Achimón, F., Pizzolitto, R. P., Ramírez Sánchez, A., Gómez Torres, E. A., Zygadlo, J. A., y Zunino, M. P. (2021). An alternative to reduce the use of the synthetic insecticide against the maize weevil *Sitophilus zeamais* through the synergistic action of *Pimenta racemosa* and *Citrus sinensis* essential oils with chlorpyrifos. *Journal of Pest Science*, 94(2), 409-421.

De León, L., Siverio, F., López, M. M., y Rodríguez, A. (2008). Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection*, 27(9), 1277-1283. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.04.004>

De Martino, L., De Feo, V., Formisano, C., Mignola, E., y Senatore, F. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Letswaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*, 14(8), 2735-2746. <https://doi.org/10.3390/molecules14082735>

De Mastro, G., Tarraf, W., Verdini, L., Brunetti, G., y Ruta, C. (2017). Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. *Food chemistry*, 235, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.019>

Deleanu, M., Popa, E. E., y Popa, M. E. (2018). Chemical composition and active properties evaluation of wild oregano (*Origanum Vulgare*) and ginger (*Zingiber Officinale* - Roscoe) essential oils. *Revista de Chimie -Bucharest- Original Edition* 69, 1927-1933. <https://doi.org/10.37358/RC.18.8.6448>

Delhey, R., Kiehr, M., Allievi, M. I., Lusto, J., Frayssinet, S., Sidoti Hartmann, B., ... y Servera, A. (2009). *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas cultivadas e invasoras del sur pampeano y norte patagónico, Argentina. *Phyton*, 78(2), 111-115.

Denancé, N., y Grimault, V. (2022). Seed pathway for pest dissemination: The ISTA Reference Pest List, a bibliographic resource in non-vegetable crops. *EPPO Bulletin*, 52(2), 434-445. <https://doi.org/10.1111/epp.12834>

Dezmirean, D. S., Paşca, C., Moise, A. R., y Bobiş, O. (2021). Plant sources responsible for the chemical composition and main bioactive properties of poplar-type propolis. *Plants*, 10(1), 22. <https://doi.org/10.3390/plants10010022>

Di Rienzo, J., Balzarini, M., Gonzalez, L., Casanoves, F., Tablada, M., y Walter Robledo, C. (2010). *Infostat: software para análisis estadístico*. Universidad Nacional de Córdoba, (Argentina). <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/10346>

Dias, L. G., Pereira, A. P., y Estevinho, L. M. (2012). Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50(12), 4246-4253. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.056>

Díaz, I. F. (2020). *Importancia de la fitopatología en la seguridad e inocuidad alimentaria: Revisión de Literatura*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

Dijksterhuis, J., y Samson, R. A. (2007). *Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food*. CRC Press.

Drago, L., De Vecchi, E., Nicola, L., y Gismondo, M. R. (2007). *In vitro* antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1914-1921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03421.x>

Dreier, J., Bermpohl, A., y Eichenlaub, R. (1995). Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 85(4), 462-468.

Dugan, F. M., Hellier, B. C., y Lupien, S. L. (2011). Resistance to *Penicillium allii* in accessions from a National Plant Germplasm System *Allium* collection. *Crop Protection*, 30(4), 483-488. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.12.021>

Egbuta, M. A., Mwanza, M., y Babalola, O. O. (2016). A review of the ubiquity of ascomycetes filamentous fungi in relation to their economic and medical importance. *Advances in Microbiology*, 6(14), 1140-1158. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.614103>

El-Baky, N. A., y Amara, A. A. A. F. (2021). Recent approaches towards control of fungal diseases in plants: An updated review. *Journal of Fungi*, 7(11), 900. <https://doi.org/10.3390/jof7110900>

Elvir, J. R. (1993). Efecto del etanol sobre las membranas biológicas. *Revista Médica Hondureña*, 61.

- EPA (2010). *Biopesticides*. <https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>
- Erb, M., y Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant physiology*, 184(1), 39-52. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00433>
- FAO (2018). *The future of food and agriculture - Alternative pathways to 2050. Summary version*. <https://www.fao.org/3/CA1553EN/ca1553en.pdf>
- FAO (2021). *Climate change fans spread of pests and threatens plants and crops*. <https://www.fao.org/news/story/es/item/1402920/icode/>
- Fayed, E. M., Abd-ElGawad, A. M., Elshamy, A. I., El-Halawany, E. S. F., y El-Amier, Y. A. (2021). Essential oil of *Deverra tortuosa* aerial parts: Detailed chemical profile, allelopathic, antimicrobial, and antioxidant activities. *Chemistry & Biodiversity*, 18(4), 2-14. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000914>
- Fernandes-Silva, C. C., Lima, C. A., Negri, G., Salatino, M. L., Salatino, A., y Mayworm, M. A. (2015). Composition of the volatile fraction of a sample of Brazilian green propolic and its phytotoxic activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(15), 3091-3095. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7045>
- Fernandes-Silva, C. C., Lima, C. A., Negri, G., Salatino, M. L., Salatino, A., y Mayworm, M. A. (2015). Composition of the volatile fraction of a sample of Brazilian green propolic and its phytotoxic activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (15), 3091-3095.
- Fernandes-Silva, C. C., Lima, C. A., Negri, G., Salatino, M. L., Salatino, A., y Mayworm, M. A. (2015). Composition of the volatile fraction of a sample of Brazilian green propolic and its phytotoxic activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(15), 3091-3095. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7045>
- Fernie, A. R., y Pichersky, E. (2015). Focus issue on metabolism: Metabolites, metabolites everywhere. *Plant Physiology*, 169(3), 1421-1423. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01499>
- Ferreira Borges, D. F., Lopes, E. A., Moraes, A. R. F., Soares, M. S., Visôto, L. E., Oliveira, C. R., y Valente, V. M. M. (2018). Formulation of botanicals for the control of plant-pathogens: A review. *Crop Protection*, 110, 135-140. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.003>
- Figueiredo, F. J. B., Dias-Souza, M. V., Nascimento, E. A., y De Lima, L. R. P. (2015). Physicochemical characterization and flavonoid contents of artisanal Brazilian green propolis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 64-8.
- Filippi, C. V. (2015). *Diversidad genómica y mapeo por asociación para la resistencia a la podredumbre húmeda del capítulo causada por Sclerotinia sclerotiorum*

en girasol. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Flood, J. (2010). The importance of plant health to food security. *Food Security*, 2(3), 215-231. <https://doi.org/10.1007/s12571-010-0072-5>

Fothergill, A. W. (2012). Antifungal susceptibility testing: clinical laboratory and standards institute (CLSI) methods en *Interactions of yeasts, moulds, and antifungal agents*. Humana Press.

FRAC, 2019. Fungicides Resistance Action Committee. <https://www.frac.info/>

Funari, C. S., y Ferro, V. O. (2006). Análise de própolis. *Food Science and Technology*, 26, 171-178. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100028>

Gallardo, D. G., Fajardo, M., Alonso, Y. N., Echemendía, L. S. M., y Copello, J. M. (2020). Physical-chemical characterization and thin layer chromatographic comparison of a local propolis with the *Mangifera indica* resin. *Pharmaceutical and Biosciences Journal*, 15-21. <https://doi.org/10.20510/ukjpb/8/i1/1581041940>

Gallez, L., Kiehr, M., Fernández, L., Delhey, R., y Stikar, D. (2014). Antifungal activity *in vitro* of propolis solutions from Argentina against two plant pathogenic fungi: *Didymella bryoniae* and *Rhizotocnia solani*. *Journal of Apicultural Research*, 53(4), 438-440. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.4.08>

Gálvez Patón, L. (2017). *Etiología, epidemiología y estrategias de control de la podredumbre del diente de ajo (Allium sativum L.)*. Tesis de Doctorado, Universidad Politécnica de Madrid (España).

Gálvez, L., y Palmero, D. (2021). Incidence and etiology of postharvest fungal diseases associated with bulb rot in garlic (*Allium sativum*) in Spain. *Foods*, 10(5), 1063. <https://doi.org/10.3390/foods10051063>

García Paoloni, M. S. (2022). *Propóleos. Buenas prácticas de producción*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., y Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106(2-3), 179-191. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.011>

Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: a review. *Bee world*, 60(2), 59-84. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097738>

Ghosh, S., McArthur, R., Guo, Z. C., McKerchar, R., Donkor, K., Xu, J., y Cheeptham, N. (2017). Evidence for Anti-Pseudogymnoascus destructans (Pd) activity of propolis. *Antibiotics*, 7(1), 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010002>

Gil, C. G. (2018). Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS): una revisión crítica. *Papeles de Relaciones Ecosociales y Cambio Global*, 140, 107-118.

Godlewska, K., Ronga, D. y Michalak, I. (2021). Plant extracts-importance in sustainable agriculture. *Italian Journal of Agronomy*, 16(2), 1851. <https://doi.org/10.4081/ija.2021.1851>

Gonnet, M. (1968). Propriétés phytoinhibitrices de quelques substances extraites de la colonie d'abeilles (*Apis mellifica* L.). I.--action sur la croissance de "*Lactuca sativa*". *Les Annales de l'Abeille*, 11(1), 41-47.

Gorostiague, M. (2016). *Aspectos moleculares y termodinámicos de la vehiculización de antimicrobianos naturales en nanocomplejos proteicos*. XX Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Grondona, E., Gatti, G., López, A. G., Sánchez, L. R., Rivero, V., Pessah, O., ... y Ponce, A. A. (2014). Bio-efficacy of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* Lamiaceae. Ssp. *hirtum*). *Plant foods for human nutrition*, 69(4), 351-357. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0441-x>

Gwinn, K. D. (2018). *Bioactive natural products in plant disease control en Studies in natural products chemistry*. Elsevier.

Habryka, C., Socha, R., y Juszcak, L. (2020). The effect of enriching honey with propolis on the antioxidant activity, sensory characteristics, and quality parameters. *Molecules*, 25(5), 1176. <https://doi.org/10.3390/molecules25051176>

Hao, Y., Kang, J., Yang, R., Li, H., Cui, H., Bai, H., ... y Shi, L. (2022). Multidimensional exploration of essential oils generated via eight oregano cultivars: compositions, chemo diversities, and antibacterial capacities. *Food Chemistry*, 374, 131629. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131629>

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., y Geneve, R. L. (1997). *Plant propagation: principles and practices*. Prentice-Hall Inc.

Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>

Hassanin, M. M., Halawa, A. E., y Ali, A. A. A. (2017). Evaluation of the activity of thyme essential oil nanoemulsion against Sclerotinia rot of fennel. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 95(3), 1037-1050. <https://doi.org/10.21608/ejar.2017.149559>

Holtappels, D., Fortuna, K., Lavigne, R., y Wagemans, J. (2021). The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.08.016>

Hossain, R., Quispe, C., Khan, R. A., Saikat, A. S. M., Ray, P., Ongalbek, D., ... y Cho, W. C. (2022). Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese medicine*, 17(1), 1-60. <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00651-2>

Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., ... y Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, 96(1), 141-153. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., y Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19 (12), 19610-19632. <https://doi.org/10.3390/molecules191219610>

Hussain, M. A., y Hassan, M. S. (2020). Evaluation of propolis activity to inhibition of opportunistic fungi isolate from soil. *Plant Archives*, 20(1), 938-940.

Inouye, S., Uchida, K., y Abe, S. (2006). Volatile composition and vapour activity against *Trichophyton mentagrophytes* of 36 aromatic herbs cultivated in Chichibu district in Japan. *International Journal of Aromatherapy*, 16(3-4), 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.ijat.2006.09.001>

ISTA (2004). International Rules for Seed Testing. The International Seed Testing Association (ISTA).

Janeczko, A. (2011). The significance of ethanol as a hormone solvent in experiments on the physiological activity of brassinosteroids. *Brassinosteroids: A class of plant hormone*, 361-374.

Jerković, I., Mastelić, J., y Miloš, M. (2001). The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. *International journal of food science & technology*, 36(6), 649-654.

Jersek, B., Ulrih, N. P., Skrt, M., Gavarić, N., Božin, B., y Možina, S. S. (2014). Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum*. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 65(2). <https://doi.org/10.2478/10004-1254-65-2014-2486>

Jia, Z., Dumont, M. J., y Orsat, V. (2016). Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience*, 15, 87-104.

Jiménez-Reyes, M. F., Carrasco, H., Olea, A. F., y Silva-Moreno, E. (2019). Natural compounds: A sustainable alternative to the phytopathogens control. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 64(2), 4459-4465.

Kadoglidou, K., Lagopodi, A., Karamanoli, K., Vokou, D., Bardas, G. A., Menexes, G., y Constantinidou, H. I. A. (2011). Inhibitory and stimulatory effects of essential oils and individual monoterpenoids on growth and sporulation of four soil-borne fungal isolates of *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium*

expansum, and *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, 130(3), 297-309. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9754-x>

Kehr, E. (2002). Descripción, requerimientos climáticos y ecofisiología de la especie. Cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) para la zona sur de Chile. *Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias* 84, 10-23

Khakimov, A. A., Omonlikov, A. U., y Utaganov, S. B. U. (2020). Current status and prospects of the use of biofungicides against plant diseases. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 13(3), 119-126. DOI: <https://doi.org/10.30574/gscbps.2020.13.3.0403>

Khaliq, A., Matloob, A., Mahmood, S., y Wahid, A. (2013). Seed pre-treatments help improve maize performance under sorghum allelopathic stress. *Journal of Crop Improvement*, 27(5), 586-605.

Khosravi, A. R., Shokri, H., Kermani, S., Dakhili, M., Madani, M., y Parsa, S. (2011). Antifungal properties of *Artemisia sieberi* and *Origanum vulgare* essential oils against *Candida glabrata* isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. *Journal de mycologie médicale*, 21(2), 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.01.006>

Kirk, P., Cannon, P., Stalpers, J. y Minter, D.W. (2008). *Dictionary of the Fungi*. CABI Publishing. Great Britain.

Kokkini, S. (8-12 de mayo de 1996). *Taxonomy, diversity and distribution of Origanum species*. Proceedings of the IPGRI international workshop on Oregano, Bari, Italia.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., y Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235-240. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00131-7)

Kumar, R., y Gupta, A. (Eds.). (2020). *Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management*. Singapore, Springer.

Kumar, S., y Singh, A. (2014). Biopesticides for integrated crop management: environmental and regulatory aspects. *Journal of Biofertilizers and Biopesticides*, 5(1), 1-3. <https://doi.org/10.4172/2155-6202.1000e121>

Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., y Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/964149>

Lacalle, A. (2008). Propoleo, el " antibiótico" natural de la colmena. *Sustrai: revista agropesquera*, 85, 56-61.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., y Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>

Laurlund, C. I. (2021). *Caracterización agroclimática de tres materiales de Orégano (Origanum sp.) bajo riego en el sur de la provincia de Buenos Aires*. [Tesina de grado, Universidad Nacional del Sur].

Le Tourneau, D. (1979). Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology*, 69(8), 887-890.

Leiva-Mora, M., Páez Martínez, P. P., Bernal Cabrera, A., Pérez Salinas, M. O., Muñoz Espinoza, M., Vasquez Freytez, C. L., y León Gordón, O. A. (2020). El complejo de especies de *Sclerotinia* y su importancia fitopatológica en cultivos tropicales. *Centro Agrícola*, 47, 29-32.

Lengai, G. M., y Muthomi, J. W. (2018). Biopesticides and their role in sustainable agricultural production. *Journal of Biosciences and Medicines*, 6(06), 7. <https://doi.org/10.4236/jbm.2018.66002>

Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., y Heredia, J. B. (2017). Essential oils of oregano: biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22(6), 989. <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>

Li, Z., y Jennings, A. (2018). Global variations in pesticide regulations and health risk assessment of maximum concentration levels in drinking water. *Journal of environmental management*, 212, 384-394. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.083>

Lima Lanna, N. D. B., Martins Bardivieso, E., Santivañez Aguilar, A., Ayala Pérez, C. P., Contreras, S., Nakada-Freitas, P. G., y Inácio Cardoso, A. I. (2020). Uso de la temperatura y propóleos en el tratamiento alternativo de semillas de calabacín. *Idesia (Arica)*, 38(4), 83-88.

Lima, A. S., Schimmel, J., Lukas, B., Novak, J., Barroso, J. G., Figueiredo, A. C., ... y Trindade, H. (2013). Genomic characterization, molecular cloning and expression analysis of two terpene synthases from *Thymus caespititius* (Lamiaceae). *Planta*, 238(1), 191-204. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1884-2>

Lo Cantore, P., Shanmugaiyah, V., y Iacobellis, N. S. (2009). Antibacterial activity of essential oil components and their potential use in seed disinfection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(20), 9454-9461.

Loc, M., Ristić, D., Grahovac, M., Bagi, F., Stojšin, V., Dudaš, T., y Budakov, D. (2018). Effects of essential oils on *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. *Biljni Lekar (Plant Doctor)*, 46(5), 570-580.

Lopez-Bellido, F. J., Lopez-Bellido, R. J., Muñoz-Romero, V., Fernandez-Garcia, P., y Lopez-Bellido, L. (2016). New phenological growth stages of garlic (*Allium sativum*). *Annals of applied biology*, 169(3), 423-439. <https://doi.org/10.1111/aab.12312>

Lozina L. A., Peichoto, M. E., Acosta, O. C., Granero, G. E. (2010). Estandarización y caracterización organoléptica y físico-química de quince propóleos argentinos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(1), 102-10.

MAGyP (2021). Producción de legumbres en Argentina. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/magyp_informe_legumbres_julio_2021.pdf

MAGyP (2021). Producción de legumbres en Argentina. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/magyp_informe_legumbres_julio_2021.pdf

Malandrakis, A. A., Markoglou, A. N., Konstantinou, S., Doukas, E. G., Kalampokis, J. F., y Karaoglanidis, G. S. (2013). Molecular characterization, fitness and mycotoxin production of benzimidazole-resistant isolates of *Penicillium expansum*. *International journal of food microbiology*, 162(3), 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.014>

Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83-99. <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>

Maroof, K., y Gan, S. H. (2020). A Review on chemical compositions, biological activity and formulation techniques of Malaysian honey bee and meliponine propolis. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 10(6), 507-523. <https://doi.org/10.1080/22311866.2020.1856716>

Martínez Galán, J. P. (2009). *Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño*. [Tesis de Magister, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia].

Matny, O. N. (2015). Efficacy evaluation of Iraqi propolis against gray mold of stored orange caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathology Journal*, 14(3), 153. <https://doi.org/10.3923/ppj.2015.153.157>

Matny, O. N., Abdul-Karim, E. K., Naemah, R. A., y Al-Ani, R. A. (2014). Activity of propolis and *Boswellia* sp. resins extract against *Sclerotinia sclerotiorum* causative agent of white rot disease of *Phaseolus vulgaris* and *Daucus carota* under storage conditions. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 2(1), 65-71.

Mechergui, K., Jaouadi, W., Coelho, J. P., y Khouja, M. L. (2016). Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) letswaart) growing in North Africa. *Industrial Crops and Products*, 90, 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.011>

Méndez, V., Valenzuela, M., Salvà-Serra, F., Jaén-Luchoro, D., Besoain, X., Moore, E. R., y Seeger, M. (2020). Comparative genomics of pathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from Chile reveals potential virulence features for tomato plants. *Microorganisms*, 8(11), 1679. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111679>

Meneses, E. A., Durango, D. L., y García, C. M. (2009). Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis. *Química nova*, 32(8), 2011-2017.

Miorini, T. J., Kamvar, Z. N., Higgins, R. S., Raetano, C. G., Steadman, J. R., y Everhart, S. E. (2019). Differential aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from North and South America and partial host resistance in Brazilian soybean and dry bean cultivars. *Tropical Plant Pathology*, 44(1), 73-81.

Mirmostafae, S., Azizi, M., y Fujii, Y. (2020). Study of allelopathic interaction of essential oils from medicinal and aromatic plants on seed germination and seedling growth of lettuce. *Agronomy*, 10(2), 163. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020163>

Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., y Arora, N. K. (2015). Biopesticides: Where We Stand?. *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facet*. Springer.

Mohammed, E., Fliou, J., Riffi, O., Amechrouq, A., y Ghouati, Y. (2020). Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Origanum compactum* from the seven regions of morocco and their antimicrobial activity. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 10(1), 42-48.

Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A., y Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical toxicology*, 46(11), 3482-3485. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.025>

Moreno, M. A., Vallejo, A. M., Ballester, A. R., Zampini, C., Isla, M. I., López-Rubio, A., y Fabra, M. J. (2020). Antifungal edible coatings containing Argentinian propolis extract and their application in raspberries. *Food Hydrocolloids*, 107, e105973. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105973>

Moreno, R. C., Lara, M. Á., Mariconda, L. E., Curzel, N. H., y Biec, M. (2011). Rendimiento de aceites esenciales de orégano desecado en secadero solar en el Alto Valle del Río Negro. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*, 15.

Morshedloo, M. R., Salami, S. A., Nazeri, V., Maggi, F., y Craker, L. (2018). Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. *Industrial Crops and Products*, 119, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.049>

Moschini, R. C., Martínez, M. I., y Sepulcri, M. G. (2013). Sistemas de pronóstico de enfermedades. *Agrometeorología*. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Muñoz, V., Cisterna, V., y France, A. (2020). *Aislamiento de microorganismos fitopatógenos*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

Mutlu, S., Atici, Ö., Esim, N., y Mete, E. (2011). Essential oils of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) induce oxidative stress in early seedlings of various weed species. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), 943-951. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0626-3>

Naciones Unidas (2019). *World population prospects 2019*. Department of Economic and Social Affairs. <https://population.un.org/wpp/>

Nascimento, M. D. G. R. D. (2020). *Aspectos genéticos e qualidade fisiológica de sementes crioulas de Phaseolus Lunatus L.* Tesis. Universidade Federal da Paraíba.

Nazarov, P. A., Baleev, D. N., Ivanova, M. I., Sokolova, L. M., y Karakozova, M. V. (2020). Infectious plant diseases: Etiology, current status, problems and prospects in plant protection. *Acta Naturae*, 12(3), 46. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11026>

Negri, G., Marcucci, M. C., Salatino, A., y Salatino, M. L. F. (1998). Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. *Apidologie*, 29(4), 305-314.

Nelson, E. B. (2018). The seed microbiome: origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil*, 422(1), 7-34. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3289-7>

Norma IRAM-INTA 15935-1 (2008). Propóleos en Bruto. Instituto Argentino de Normalización

Norma IRAM-INTA 15935-2 (2008). Extractos de Propóleos. Instituto Argentino de Normalización

Novak, J., Lukas, B., y Franz, C. (2010). Temperature influences thymol and carvacrol differentially in *Origanum* spp. (Lamiaceae). *Journal of essential oil research*, 22(5), 412-415. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700359>

Olmedo, R., Nepote, V., y Grosso, N. R. (2014). Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. *Food chemistry*, 156, 212-219. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.087>

Ordóñez, R. M., Zampini, I. C., Moreno, M. N., y Isla, M. I. (2011). Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria.

Microbiological Research, 166(7), 578-584.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.11.006>

Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y., y Balci, I. (2005). Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 140-143. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.140-143.2005>

Özcan, M. (1999). Antifungal properties of propolis. *Grasas y aceites*, 50(5), 395-398. <https://doi.org/10.3989/gya.1999.v50.i5.685>

Palomino García, L. R., Martínez Galán, J. P., García Pajón, C. M., Gil González, J. H., y Durango Restrepo, D. L. (2010). Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(1), 5373-5383.

Patra, A. K., y Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1198-1222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.010>

Pereira, D. S., Santana de Oliveira, M., Cruz, J. N., do Nascimento Bezerra, P., Gomes da Silva, A., Pereira, N. S., ... y Alves Freitas, C. I. (2021). Herbicidal potential (phytotoxic) of honey bee propolis extracts of the Brazilian northeast on weeds of cultivated pastures. *Journal of Apicultural Research*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1957611>

Pereira, L., Cunha, A., y Almeida-Aguiar, C. (2022). Portuguese propolis from Caramulo as a biocontrol agent of the apple blue mold. *Food Control*, 139, 109071. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109071>

Pérez-Alfonso, C. O., Martínez-Romero, D., Zapata, P. J., Serrano, M., Valero, D., y Castillo, S. (2012). The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. *International Journal of Food Microbiology*, 158(2), 101-106. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.002>

Pérez-Pérez, J. U., Guerra-Ramírez, D., Reyes-Trejo, B., Cuevas-Sánchez, J. A., y Guerra-Ramírez, P. (2020). Actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de *Jatropha dioica* Seseé contra bacterias fitopatógenas de tomate. *Polibotánica*, 125-133. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.49.8>

Piana, M. L., Oddo, L. P., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanov, S., y Declerck, C. G. (2004). Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie*, 35(1), 26-37.

Pobiega, K., Kraśniewska, K., y Gniewosz, M. (2019). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. *Trends in food science & Technology*, 83, 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.007>

Popp, J., Pető, K., y Nagy, J. (2013). Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for sustainable development*, 33(1), 243-255. <https://doi.org/10.1007/s13593-012-0105-x>

Portella, J., Orlandi, R. C., Almeida, J., Koefender, J., Schoffel, A., y Camera, J. N. (2021). Óleos essenciais no controle *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Revista Thema*, 19(3), 615-622. <https://doi.org/10.15536/thema.V19.2021.615-622.2367>

Prins, C. L., Vieira, I. J., y Freitas, S. P. (2010). Growth regulators and essential oil production. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(2), 91-102.

Probst, I. S., Sforcin, J. M., VLM, R., Fernandes, A. A. H., y Fernandes Júnior, A. (2011). Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17, 159-167.

Purdy, L. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, 69(8), 875-880.

Quezado-Duval, A. M., Leite Jr, R. P., Truffi, D., y Camargo, L. E. (2004). Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil. *Plant Disease*, 88(2), 157-161. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.157>

Quiroga, P. R., Grosso, N. R., Lante, A., Lomolino, G., Zygadlo, J. A., y Nepote, V. (2013). Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(3), 642-649. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12011>

Rabelino, P. G., Zignago, A., y Silvera-Pérez, E. (2009). Caracterización *in vitro* de bacterias fitopatógenas en dos extractos de propóleos de diferentes orígenes fitogeográficos. *Centro Agrícola*, 36(4), 43-48.

Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., y Job, D. (2012). Seed germination and vigor. *Annual review of plant biology*, 63(507), 2012.

Ramezani, S., Saharkhiz, M. J., Ramezani, F., y Fotokian, M. H. (2008). Use of essential oils as bioherbicides. *Journal of Essential oil bearing plants*, 11(3), 319-327. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643636>

Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop protection*, 29(9), 913-920. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>

Raveau, R., Fontaine, J., y Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2020). Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A review. *Foods*, 9(3), 365. <http://dx.doi.org/10.3390/foods9030365>

Retamoso, R. M., Ruiz, G. B., y Benitez Ahrendts, M. R. (2019). Antifungal Activity in Propolis Extracts Obtained in Jujuy, Argentina. *SSRG International Journal of Applied Chemistry* 6(3). <http://dx.doi.org/10.14445/23939133/IJAC-V6I3P101>

Ricci, D., Epifano, F., y Fraternali, D. (2017). The essential oil of *Monarda didyma* L. (Lamiaceae) exerts phytotoxic activity in vitro against various weed seeds. *Molecules*, 22(2), 222. <https://doi.org/10.3390/molecules22020222>

Rienth, M., Crovadore, J., Ghaffari, S., y Lefort, F. (2019). Oregano essential oil vapour prevents *Plasmopara viticola* infection in grapevine (*Vitis Vinifera*) and primes plant immunity mechanisms. *PLoS One*, 14(9), 1-29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222854>

Rivera, M. C., y Wright, E. R. (2020). *Apuntes de patología vegetal: fundamentos y prácticas para la salud de las plantas*. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Rocha, I., Ma, Y., Souza-Alonso, P., Vosátka, M., Freitas, H., y Oliveira, R. S. (2019). Seed coating: a tool for delivering beneficial microbes to agricultural crops. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1357. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01357>

Rodríguez-García, I., Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramírez, L. A., Leyva, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz-Valenzuela, M. R., ... y Ayala-Zavala, J. F. (2015). Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1717-1727. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2013.800832>

Rostro-Alanis, M. D. J., Báez-González, J., Torres-Alvarez, C., Parra-Saldívar, R., Rodríguez-Rodríguez, J., y Castillo, S. (2019). Chemical composition and biological activities of oregano essential oil and its fractions obtained by vacuum distillation. *Molecules*, 24(10), 1904. <https://doi.org/10.3390/molecules24101904>

Rouquaud, E., y Videla, M. E. (2000). Orégano de Mendoza (Argentina). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 32(1).

SAGyP (2023). *Producción de ajo en Argentina. Evolución del cultivo hasta la temporada 2021/22*. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sagyp-informe-produccion-ajo-febrero-2023.pdf>

Saharan, G. S., y Mehta, N. (2008). *Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management*. Springer Science & Business Media.

Sakkas, H., y Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 429-438. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>

Salamanca Grosso, G. (2017). *Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo*. Universidad de Tolima.

Salatino, A., y Salatino, M. L. F. (2017). Why do honeybees exploit so few plant species as propolis sources?. *MOJ Food Processing & Technology*, 4(5), 3.

Salatino, A., y Salatino, M. L. F. (2021). Scientific note: Often quoted, but not factual data about propolis composition. *Apidologie*, 52(2), 312-314. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00821-x>

Salinas, M. C., y Cavagnaro, P. F. (2020). *In vivo* and *in vitro* screening for resistance against *Penicillium allii* in garlic accessions. *European Journal of Plant Pathology*, 156(1), 173-187. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01875-z>

Samaras, A., Ntasiou, P., Myresiotis, C., y Karaoglanidis, G. (2020). Multidrug resistance of *Penicillium expansum* to fungicides: whole transcriptome analysis of MDR strains reveals overexpression of efflux transporter genes. *International Journal of Food Microbiology*, 335, e108896. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108896>

Sampietro, D. A. (2003). Aleopatía: Concepto, características, metodología de estudio e importancia. *Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes*.

Sampietro, D. A., Bertini Sampietro, M. S., y Vattuone, M. A. (2020). Efficacy of Argentinean propolis extracts on control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(12), 4575-4582. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10516>

Sampietro, D. A., Lizarraga, E. F., Ibatayev, Z. A., Omarova, A. B., Suleimen, Y. M., y Catalán, C. A. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Acantholippia deserticola*, *Artemisia proceriformis*, *Achillea micrantha* and *Libanotis buchtormensis* against phytopathogenic bacteria and fungi. *Natural product research*, 30(17), 1950-1955. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1091453>

Sanahuja, J. A., y Tezanos Vázquez, S. (2017). Del milenio a la sostenibilidad: retos y perspectivas de la Agenda 2030 para el desarrollo sostenible. *Política y Sociedad*, 54(2), 533-555. <https://doi.org/10.5209/POSO.51926>

Sánchez Llorens, J. L. (2017). Introducción a la sanidad vegetal. *Principios de sanidad vegetal* (pp. 14-21). Editorial Síntesis S.A. <https://apunteca.usal.edu.ar/id/eprint/2127>

Santos, L. M., Fonseca, M. S., Sokolonski, A. R., Deegan, K. R., Araújo, R. P., Umsza-Guez, M. A., ... y Machado, B. A. (2020). Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1369-1382. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10024>

Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J. N., y Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, 4(4), 519-537. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0200-5>

Sawaya, A. C. H. F., Palma, A. M., Caetano, F. M., Marcucci, M. C., da Silva Cunha, I. B., Araujo, C. E. P., y Shimizu, M. T. (2002). Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology*, 35(3), 203-207. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01169.x>

Schwartz, H. F., y Singh, S. P. (2013). Breeding common bean for resistance to white mold: A review. *Crop science*, 53(5), 1832-1844. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.02.0081>

Semida, W. M., y Rady, M. M. (2014). Presoaking application of propolis and maize grain extracts alleviates salinity stress in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Scientia Horticulturae*, 168, 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.042>

Sforcin, J. M., y Bankova, V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of ethnopharmacology*, 133(2), 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>

Sharma, K. K., Singh, U. S., Sharma, P., Kumar, A., y Sharma, L. (2015). Seed treatments for sustainable agriculture-A review. *Journal of Applied and Natural Science*, 7(1), 521-539. <https://doi.org/10.31018/jans.v7i1.641>

Silici, S., y Karaman, K. (2013). Inhibitory effect of propolis on patulin production of *Penicillium expansum* in apple juice. *Journal of Food Processing and preservation*, 38(3), 1129-1134. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12072>

Silva, R. A. D., Rodrigues, A. E., Ribeiro, M. C. M., Custódio, Â. R., Andrade, N. E. D., y Pereira, W. E. (2006). Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural*, 36, 1842-1848. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000600027>

Simone-Finstrom, M., y Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41(3), 295-311. <https://doi.org/10.1051/apido/2010016>

SINAVIMO (2022). *Sclerotinia sclerotiorum*. <https://www.sinavimo.gob.ar/plaga/sclerotinia-sclerotiorum>

Sinclair, J. B. (1979). The seed: a microcosm of microbes. *Journal of Seed Technology*, 68-73.

Singh, N. S., Sharma, R., Parween, T., y Patanjali, P. K. (2018). Pesticide contamination and human health risk factor. En *Modern age environmental problems and their remediation* (pp. 49-68). Springer.

Skwarczynski, M., Bashiri, S., Yuan, Y., Ziora, Z. M., Nabil, O., Masuda, K., ... y Toth, I. (2022). Antimicrobial Activity Enhancers: Towards Smart Delivery of Antimicrobial Agents. *Antibiotics*, 11(3), 412. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030412>

Smith, R. (2019). A Review on the antimicrobial activity of propolis and its synergy with other antimicrobial compounds. *Medical & Clinical Research*, 4(5), 1-8.

Smolińska, U., y Kowalska, B. (2018). Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*—a review. *Journal of Plant Pathology*, 100(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0023-0>

Sobrero, M. C., y Ronco, A. (2004). *Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (Lactuca sativa L.)*. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

Sosa, S., Bornancin, A., Tubaro, A., y Loggia, R. D. (2007). Topical antiinflammatory activity of an innovative aqueous formulation of actichelated® propolis vs two commercial propolis formulations. *Phytotherapy Research*, 21(9), 823-826. <https://doi.org/10.1002/ptr.2206>

Sosa-López, A., Subovsky, M. J., Castillo, A. E., Ramirez, S. S., Rolin, H., y Oviedo, B. (2000). Calidad de los propóleos de la Provincia de Misiones. *Universidad Nacional del Nordeste*. http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/5_agrarias/a_pdf/a_030.pdf

Soylu, E. M., Soyly, S., y Kurt, S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 161, 119-128.

Soylu, S., Yigitbas, H., Soyly, E. M., y Kurt, Ş. (2007). Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1021-1030. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03310.x>

Sparks, T. C., Hahn, D. R., y Garizi, N. V. (2016). Natural products, their derivatives, mimics and synthetic equivalents: role in agrochemical discovery. *Pest management science*, 73(4), 700-715. <https://doi.org/10.1002/ps.4458>

Stikar, D. (2008). Propóleos: ¿alternativa para control de patógenos en agricultura? [Tesis de grado, Universidad Nacional del Sur].

Šturm, L., y Ulrich, N. P. (2019). Advances in the propolis chemical composition between 2013 and 2018: A review. *eFood*, 1(1), 24-37. <https://doi.org/10.2991/efood.k.191029.001>

Šuran, J., Capanec, I., Mašek, T., Radić, B., Radić, S., Tlak Gajger, I., y Vlainić, J. (2021). Propolis extract and its bioactive compounds - From traditional to modern

extraction technologies. *Molecules*, 26(10), 2930.
<https://doi.org/10.3390/molecules26102930>

Swanson, B. G., Hughes, J. S., y Rasmussen, H. P. (1985). Seed microstructure: review of water imbibition in legumes. *Food Structure*, 4(1), 14.

Talero, C., Hernández, D., y Figueroa, J. (2012). Calidad microbiológica de propóleo crudo y sólidos solubles de extractos de propóleos de *Apis mellifera* en Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 59(2), 109-118.

Tao, N., Jia, L., y Zhou, H. (2014). Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food chemistry*, 153, 265-271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.070>

Tapwal, A., Garg, S., Gautam, N., y Kumar, R. (2011). *In vitro* antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. *Brazilian archives of biology and technology*, 54, 1093-1098. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000600003>

Tashiro, N., Manabe, K., y Ide, Y. (2012). Emergence and frequency of highly benzimidazole-resistant *Colletotrichum gloeosporioides*, pathogen of Japanese pear anthracnose, after discontinued use of benzimidazole. *Journal of General Plant Pathology*, 78(3), 221-226.

Teixeira, P. H., Lima, R. C., Bonicontró, B. F., Mendes, O. L., Soares, B. A., Carneiro, J. E., ... y Vieira, R. F. (2019). Management of white mold in common bean using partial resistance and fungicide applications. *Crop Protection*, 124, 104867. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104867>

Tibaldi, G., Fontana, E., y Nicola, S. (2011). Growing conditions and postharvest management can affect the essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1516-1522. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.05.008>

Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., y Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20260-20264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>

Tiwari, R., y Rana, C. S. (2015). Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.

Tiwari, R., y Rana, C. S. (2015). Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.

Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., y Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-14. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/697390>

Torres, L. E. (2011). *Caracterización y evaluación de genotipos de orégano cultivados en las principales zonas de producción de Argentina*. [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Córdoba].

Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., y Bruni, A. (1996). Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytotherapy research*, 10(4), 335-336. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199606\)10:4<335::AID-PTR828>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199606)10:4<335::AID-PTR828>3.0.CO;2-7)

Tournas, V. H. (2005). Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Critical reviews in microbiology*, 31(1), 33-44. <https://doi.org/10.1080/10408410590886024>

Trenc, J. (2001). Percepción del riesgo y uso de pesticidas en la agricultura. *Ecología política*, 22, 17-30.

Tronsmo, A. M., Collinge, D. B., Djurle, A., Munk, L., Yuen, J., y Tronsmo, A. (2020). *Plant pathology and plant diseases*. CABI.

Tsedaley, B. (2015). Review on seed health tests and detection method of seedborne diseases. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5(5).

Tu, J. C. (1988). The role of white mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of Phytopathology*, 121(1), 40-50.

Tu, J. C. (1997). An integrated control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans, with emphasis on recent advances in biological control. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 38, 73-76.

Türkmen, M., Kara, M., Maral, H., y Soylu, S. (2021). Determination of chemical component of essential oil of *Origanum dubium* plants grown at different altitudes and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 15787. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15787>

Valdez, J. G., Makuch, M. A., Ordovini, A. F., Frisvad, J. C., Overy, D. P., Masuelli, R. W., y Piccolo, R. J. (2009). Identification, pathogenicity and distribution of *Penicillium* spp. isolated from garlic in two regions in Argentina. *Plant pathology*, 58(2), 352-361. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01411.x>

Valdez, J. G., Makuch, M. A., Ordovini, A. F., Masuelli, R. W., Overy, D. P., y Piccolo, R. (2006). First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*). *Plant Pathology*, 55, 583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01420.x>

Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., y Gil, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, 11(11), 2786. <https://doi.org/10.3390/nu11112786>

Vallad, G. E., y Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop science*, 44(6), 1920-1934. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1920>

Vázquez, J. C. (2011). *Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la región apícola I-Cuenca del Salado, Pcia. de Buenos Aires*. [Tesis de Doctorado, Universitat Politècnica de València].

Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., Turon, C., y Marin, S. (2004). Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. *Journal of applied microbiology*, 96(4), 716-724. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02212.x>

Verdeguer, M., Sánchez-Moreiras, A. M., y Araniti, F. (2020). Phytotoxic effects and mechanism of action of essential oils and terpenoids. *Plants*, 9(11), 1571. <https://doi.org/10.3390/plants9111571>

Vidaver, A. K., y Lambrecht, P. A. (2004). *Bacteria as plant pathogens*. The Plant Health Instructor. <http://dx.doi.org/10.1094/PHI-I-2004-0809-01>

Vincent, M. A., y Pitt, J. I. (1989). *Penicillium allii* a new species from Egyptian garlic. *Mycologia*, 81(2), 300-303. <https://doi.org/10.1080/00275514.1989.12025662>

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... y Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343-371. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>

Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A., y Efthimiadou, A. (2013). Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 86-92. <https://doi.org/10.15835/nbha4118931>

Volcy, C. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 107-115.

Wagh, V. D. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/308249>

Wang, A. R., Lin, W. W., Chen, X. T., Lu, G. D., Zhou, J., y Wang, Z. H. (2008). Isolation and identification of Sclerotinia stem rot causal pathogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(10), 818-822.

Wang, S., Xu, T., y Li, X. (2022). Development Status and Perspectives of Crop Protection Machinery and Techniques for Vegetables. *Horticulturae*, 8(2), 166. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020166>

Waterman, P. G. (2007). *Roles for secondary metabolites in plants*. *Ciba Foundation Symposium*, 171, 255-275.

Werrie, P. Y., Durenne, B., Delaplace, P., y Fauconnier, M. L. (2020). Phytotoxicity of essential oils: Opportunities and constraints for the development of biopesticides. A review. *Foods*, 9(9), 1291. <https://doi.org/10.3390/foods9091291>

Wieczorek, P. P., Hudz, N., Yezerska, O., Horčinová-Sedláčková, V., Shanaida, M., Korytniuk, O., y Jasicka-Misiak, I. (2022). Chemical Variability and Pharmacological Potential of Propolis as a Source for the Development of New Pharmaceutical Products. *Molecules*, 27(5), 1600. <https://doi.org/10.3390/molecules27051600>

Willbur, J., McCaghey, M., Kabbage, M., y Smith, D. L. (2019). An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. *Tropical Plant Pathology*, 44(1), 3-11.

Wink, M. (2008). Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Natural Product Communications*, 3(8), 1205-1216.

Woisky, R. G., y Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*, 37(2), 99-105. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

Xu, X., Pu, R., Li, Y., Wu, Z., Li, C., Miao, X., y Yang, W. (2019). Chemical compositions of propolis from China and the United States and their antimicrobial activities against *Penicillium notatum*. *Molecules*, 24(19), 3576. <https://doi.org/10.3390/molecules24193576>

Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A., y Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of gyrB and rpoD genes. *Microbiology*, 146(10), 2385-2394. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-146-10-2385>

Yang, S., Peng, L., Cheng, Y., Chen, F., y Pan, S. (2010). Control of citrus green and blue molds by Chinese propolis. *Food Science and Biotechnology*, 19(5), 1303-1308. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0186-8>

Zampini, I. C., Salas, A. L., Maldonado, L. M., Simirgiotis, M. J., y Isla, M. I. (2021). Propolis from the Monte region in Argentina: A potential phytotherapeutic and food functional ingredient. *Metabolites*, 11(2), 76. <https://doi.org/10.3390/metabo11020076>

Zanellato, M., Masciarelli, E., Casorri, L., Boccia, P., Sturchio, E., Pezzella, M., ... y Caporali, F. (2009). The essential oils in agriculture as an alternative strategy to herbicides: a case study. *International Journal of Environment and Health*, 3(2), 198-213. <https://doi.org/10.1504/IJEnvH.2009.024878>

Zhang, Y. Q., Gamarra, S., Garcia-Effron, G., Park, S., Perlin, D. S., y Rao, R. (2010). Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of

azole drugs. *PLoS Pathogens*, 6(6), 1000939.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000939>

Zignago Paulos, A. C. (2011). *Estudio in vitro de la actividad antimicrobiana de dos propóleos frente a bacterias fitopatógenas*. [Tesis de grado, Universidad de la República, Uruguay].

ANEXO - Publicaciones científicas

A continuación, se describe la productividad en términos de publicaciones científicas durante el desarrollo de esta tesis:

• Cibanal I. L., Krepper G., García Paoloni M. S., Pistonesi M. F. (2023). Propolis extract significantly reduces microbial load in fresh bee pollen for human consumption. *EUNK Revista científica de Abejas y Apicultores*, 2(1), 13-18. <https://doi.org/10.52559/eunk.v2i1.32>

• Cibanal, I. L., Fernández, L. A., Rodríguez S. A., Pellegrini, C. N., Gallez, L. M. (2022). Propolis extract combined with oregano essential oil applied to lima bean seeds against *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 164(1), 33-43. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02536-4>

• Cibanal, I. L., Fernández, L. A., Murray, A. P., Pellegrini, C. N., Gallez, L. M. (2021). Propolis extract and oregano essential oil as biofungicides for garlic seed cloves: *in vitro* assays and synergistic interaction against *Penicillium allii*. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1909-1918. <https://doi.org/10.1111/jam.15081>

• Cibanal I. L., Fernández L. A., Galletta Positano G., Boffano Chebataroff L., Garayalde A. F., Gallez L. M., Silvera Pérez E. (2020). Chemical characterization and *in vitro* antimicrobial activity of honeybee propolis and *Scaptotrigona jujuyensis* geopropolis against tomato pathogenic bacteria. *Semina: Ciências Agrárias*, 41(5), 1799-1808. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n5p1799>

• Cibanal I. L., Fernández L. A., Krepper G., Pellegrini C. N., Gallez L. M. (2019). Avances en el desarrollo de un biofungicida: caracterización físico-química y actividad antifúngica de propóleos. *Agrociencia Uruguay*, 23(2), 1-10. <https://doi.org/10.31285/AGRO.23.83>

• Fernández L. A., Cibanal I. L., Livia Paraluppi A., Freitas C., Gallez L. M. (2019). Propolis as a potential alternative for the control of *Dekkera bruxellensis* in bioethanol fermentation. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(5), 2071-2078. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n5p20716>