

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EFEECTO *in vitro* E *in vivo* DE EXTRACTOS DE  
MACROHONGOS SOBRE EL DESARROLLO DE *Botrytis*  
*cinerea* Y *Penicillium expansum*.**

**PATRICIA ANDREA UGALDE DÍAZ**

SANTIAGO- CHILE  
2014

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TÍTULO

**EFECTO *in vitro* E *in vivo* DE EXTRACTOS DE  
MACROHONGOS SOBRE EL DESARROLLO DE *Botrytis*  
*cinerea* Y *Penicillium expansum*.**

***In vitro* AND *in vivo* EFFECT OF MUSHROOM EXTRACTS  
ON THE GROWTH OF *Botrytis cinerea* AND *Penicillium*  
*expansum***

**PATRICIA ANDREA UGALDE DÍAZ**

SANTIAGO- CHILE  
2014

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**EFECTO *in vitro* E *in vivo* DE EXTRACTOS DE  
MACROHONGOS SOBRE EL DESARROLLO DE *Botrytis*  
*cinerea* Y *Penicillium expansum*.**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Agrónomo

**PATRICIA ANDREA UGALDE DÍAZ**

<b>PROFESOR GUÍA</b>	Calificaciones
Sr. José Luis Henríquez S. Ingeniero Agrónomo, M. Sc., Ph. D.	7,0
<b>PROFESORES EVALUADORES</b>	
Sra. Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo, M. Sc	7,0
Sr. Danilo Aros O. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	6,4

Santiago, Chile. 2014



## INDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
Hipótesis:.....	8
Objetivos: .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS .....	9
Lugar de estudio .....	9
Obtención de cepas de los patógenos .....	9
Obtención de extractos alcohólicos a partir de macrohongos.....	9
Determinación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de extractos de macrohongos sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidias de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium expansum</i> . .....	11
Determinación <i>in vivo</i> de la actividad inhibitoria del extracto de 5 macrohongos.....	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	15
Determinación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de extractos de macrohongos sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidias de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium expansum</i> . .....	15
Inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> .....	15
Inhibición de la germinación de conidias de <i>Botrytis cinerea</i> .....	17
Inhibición del crecimiento micelial de <i>Penicillium expansum</i> .....	19
Determinación <i>in vivo</i> de la actividad inhibitoria del extracto de 5 macrohongos seleccionados.....	23
Actividad de extractos en bayas desinfectadas e inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> .....	23
Actividad de extractos en bayas sin desinfectar inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> . .....	23
Actividad de extractos en bayas desinfectadas inoculadas con <i>Penicillium expansum</i> . .....	24

Actividad de extractos en bayas sin desinfectar inoculadas con <i>Penicillium expansum</i> .	25
CONCLUSIONES .....	27
BIBLIOGRAFIA .....	28

## RESUMEN

El control de enfermedades de poscosecha es una problemática constante en la producción de uva de mesa, siendo *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, dos de los patógenos más importantes. El cuestionamiento a la cantidad máxima de residuos de agroquímicos permitidos en la fruta en los mercados de destino y la acotada cantidad de fungicidas disponibles en el mercado, han llevado a la búsqueda de alternativas a los fungicidas sintéticos, la cual se ha enfocado a productos naturales, amigables con el medio ambiente y libres de residuos. El principal objetivo de este estudio fue evaluar la actividad de 15 extractos de macrohongos en el control de ambos patógenos. Los macrohongos fueron colectados desde su ambiente natural, posteriormente secados, triturados y macerados en alcohol al 95%, y los extractos resultantes fueron utilizados en bioensayos de inhibición *in vitro* e *in vivo*. Para el control *in vitro* se enmendó agar papa dextrosa con cada extracto en etanol al 1% donde se sembró micelio y conidias de los patógenos. El control *in vivo* se realizó sobre bayas de uva de mesa del cv. Red Globe sometidas o no a desinfección previa con NaClO (0,5%). A las bayas se les realizó una herida y luego se aplicaron los extractos 1 y 24 horas antes de la inoculación con conidias de los patógenos. Los extractos con mayor efectividad inhibitoria *in vitro* del crecimiento miceliar de *B. cinerea* fueron *Suillus luteus*, *Agarical sp.* y *Amanita sp.* los que inhibieron en un 92,9, 71,0 y 69,4%, respectivamente. Para el control *in vitro* de *P. expansum* los dos extractos que tuvieron un mayor efecto fueron los de *Agarical sp.* y *Agaricus arvensis* con un 35,3 y 34,6% de inhibición del crecimiento miceliar, respectivamente. Los extractos con mayor efectividad en la inhibición de la germinación de conidias fueron: *Agarical sp.* y *Macrolepiota rhacodes*, para *B. cinerea*, y *Agaricus arvensis* y *Laetiporus sulphureus* para *P. expansum*. En el control *in vivo* solo el extracto de *Amanita sp.* tuvo un efecto en la inhibición de la pudrición causada por *B. cinerea* sobre las bayas, aplicado 24 horas antes de la inoculación, e igualmente en bayas sin desinfectar inoculadas con *P. expansum*.

Palabras claves: Control natural, pudrición gris, moho azul

## SUMMARY

Postharvest rots of table grapes are a constant problem for the industry with *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* as the most important pathogens. Restrictions on the maximum amount of pesticide residues allowed on the fruit, and the limited number of fungicides registered in the markets have prompted the look for alternatives to the traditional chemical fungicides, focusing mainly on natural products environmentally friendly and free from residue restrictions. This study was aimed to evaluate the activity of 15 extracts of mushrooms in the control of both pathogens. The mushrooms were collected from their natural sources, dried, grounded and macerated in ethanol 95%, and the extracts obtained were evaluated *in vitro* and *in vivo*. Potato dextrose agar media was amended with the ethanol extracts at a rate of 1%, for the *in vitro* tests with mycelia or conidia of the pathogens. *In vivo* assays were conducted on Red Globe berries that were surface disinfected with NaOCl (0,5 %) or not disinfected at all. The berries were wound inoculated with a spore suspension of each pathogen 1 or 24 hours after the extracts treatments. The extracts that gave the greatest inhibition of the mycelial growth of *B. cinerea* were those of *Suillus luteus*, Agarical *sp.* and *Amanita sp.*, which gave a 92.9, 71.0 and 69.4 % inhibition, respectively. While the extracts with the higher inhibition of the mycelial growth of *P. expansum* were those of Agarical *sp.* and *Agaricus arvensis* with 35.3 and 34.6 % inhibition, respectively. The extracts with the higher inhibition of the conidia germination were those of Agarical *sp.* and *Macrolepiota rhacodes*, for *B. cinerea*, and *Agaricus arvensis* and *Laetiporus sulphureus* for *P. expansum*. Only the extract of *Amanita sp.* reduced the rot caused by *B. cinerea* when applied 24 hours before berry inoculation and the rot caused by *P. expansum* on berries that were not disinfected.

Key words: Natural control, gray mold, blue mold

## INTRODUCCIÓN

Chile es el primer exportador de uva de mesa a nivel mundial (FAO, 2011). La superficie plantada ha ido aumentando sostenidamente durante los últimos años, llegando a 53.727 hectáreas en 2013, lo que equivale al 20% del área dedicada a la producción de frutales en el país. En 2013, la producción total exportada de uva de mesa superó las 853.334 toneladas, un 3,3% superior a la temporada anterior con un valor equivalente a US\$1.506,2 millones (ODEPA, 2013).

Los principales mercados de destino son Estados Unidos y Europa lo que implica un mayor tiempo de transporte desde origen a destino para llegar al consumidor final, en el cual se pueden producir problemas fitopatológicos. Los problemas causados por patógenos en poscosecha se conocen como pudriciones, las pérdidas que se producen o el peligro de pérdidas por deterioro causado por patógenos debe ser considerado en todas las prácticas de manejo de pre y poscosecha.

Dos de las principales pudriciones presentes en Chile son las producidas por: *Botrytis cinerea* Pers. y *Penicillium expansum* Link, agentes causales de la pudrición gris y del moho azul, respectivamente.

*Botrytis cinerea*, es uno de los patógenos más importantes y ampliamente distribuidos en el mundo, produce el tizón de las inflorescencias, cancrrosis, pudriciones del tallo, pudrición de los frutos en pre y poscosecha, ocasionando pudriciones blandas en frutos. Sobre las zonas afectadas se produce una capa de moho gris, preferentemente cuando el clima es húmedo y fresco (Agrios, 2004). Hay una gran cantidad de cultivos que son afectados por *B. cinerea*, pero en la uva de mesa tiene gran importancia porque es en donde causa las mayores pérdidas económicas.

El moho azul es una de las enfermedades de poscosecha más destructivas, afectando también una gran variedad de especies. El hongo penetra por heridas e incluso por lenticelas (Agrios, 2004). En uva de mesa produce pudriciones blandas y acuosas, que se pueden desarrollar a más de 30 días luego de ser cosechadas y almacenadas (Donoso y Latorre, 2006).

Los dos patógenos se mantienen activos a temperaturas cercanas a los 0°C, por lo que producen problemas durante el almacenamiento refrigerado (Agrios, 2004). Además, las pudriciones causadas por estos patógenos se incrementan cuando se interrumpe la cadena de frío, al momento de la comercialización. Hace algunos años el moho azul no presentaba una real importancia en el país, y frecuentemente por un menor conocimiento se confundía con el daño provocado por la pudrición gris. Sin embargo existen diferencias entre estos dos problemas fitopatológico; por ejemplo las lesiones provocadas por *B. cinerea* tienen bordes irregulares, con crecimiento de micelio algodonoso blanco grisáceo, esporulación grisácea, mientras que las lesiones causadas por *P. expansum* tienen bordes mas definidos y las bayas infectadas se tornan de un color más claro que la tonalidad normal (Nawrath y Henríquez, 2008), además el crecimiento del micelio es escaso e inicialmente de color blanco y luego de una coloración verde azulosa

El control de estas pudriciones se realiza mediante la aplicación de fungicidas en pre y poscosecha. Uno de los problemas más frecuentes que se ha presentado en los últimos años es la resistencia a fungicidas, que se define como “un cambio heredable y estable de un hongo a la acción de un fungicida, lo que se traduce en una menor sensibilidad al compuesto químico” (Delp y Dekker, 1985). Dependiendo de su forma de acción existen fungicidas que son más proclives a desarrollar resistencia en los patógenos que otros; los fungicidas unisitio, presentan una mayor probabilidad de desarrollar un mecanismo que evite la acción del producto. Por otro lado, existen fungicidas multisitio que atacan muchos sitios del metabolismo del hongo, por lo que es más difícil que éste desarrolle resistencia (Álvarez, 1989). En Chile se ha reportado la presencia de aislados de *B. cinerea* con resistencia a dicarboximidias (iprodione) (Carreño y Álvarez, 1989), anilinyrimidinas,

(Spadaro, 2002) hydroxyanilidas (fenexamide) (Esterio *et al.*, 2007), carboxamidas (boscalid) (Esterio *et al.*, 2011), e incluso a estrobilurinas (Copier, 2013) en aislados colectados de uva de mesa del valle central.

Existen muchos problemas asociados a la aplicación de fungicidas tradicionales, por la contaminación que provocan en el medio ambiente, ya que al ser mal utilizados pueden contaminar flujos de agua superficiales y subterráneos (Aguilar y Pérez, 2008; Leporati *et al.*, 2003; Pérez y Aguilar, 2012), además de ser perjudiciales para la salud humana y de animales (Martínez *et al.*, 2012). Por otro lado, la utilización de éstos eleva los costos de producción, ya que los productos tienen altos precios y en ocasiones no son bien aplicados ni bien dosificados. Además actualmente los mercados de destino de la fruta exportada, son cada vez más exigentes con respecto al nivel y número de moléculas residuales presentes en la fruta exportada (CODEX, 2014). Es por esto que la búsqueda de alternativas menos contaminantes y en lo posible de baja residualidad o libre de residuos, como es el caso de extractos naturales de plantas u hongos, se presenta como una interesante estrategia para el control de enfermedades.

Históricamente varias plantas se han utilizado en medicina tradicional, en tratamientos de infecciones virales, como antibióticos, estimulantes del sistema inmune y en una larga lista de afecciones humanas (Domingo y López-Brea, 2003). En Chile existen reportes del efecto de plantas en el control de enfermedades en humanos (Muñoz *et al.*, 2004; Lazo, 1990). Su uso se ha traspasado también a la agricultura, como alternativas naturales o como base en la elaboración de productos químicos, como fungicidas, insecticidas, nematocidas y bactericidas, algunos utilizados ya de forma industrial como los extractos de cítricos y el aceite del árbol australiano del té (Reuveni *et al.*, 2009), y otros se han estudiado de forma experimental como alternativas más ecológicas, tal es el caso de extractos de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis* Smith), en donde se determinó su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Trichoderma harzianum* R., *Absidia sp.* y *Fusarium oxysporum* Schlecht (Alzate *et al.*, 2009). También se han determinado efectos en extractos alcohólicos vegetales, por ej. un notable efecto de inhibición en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii*

Sacc. y de *Thielaviopsis basicola* Berk. & Br. (Alcalá de Marcano *et al.*, 2005). En otros estudios del control de hongos fitopatógenos con extractos vegetales de más de 200 especies, se obtuvo que la mayoría de los extractos presenta algún tipo de inhibición, ya sea sobre el crecimiento del micelio o sobre la germinación de conidias o esporas, a nivel *in vitro*, *in vivo* o ambos (Montes *et al.*, 2000).

Por otro lado existen algunos antecedentes que indican que algunos metabolitos producidos por macrohongos presentarían también un efecto inhibitorio sobre algunos patógenos fungosos. Este tipo de hongos se caracterizan por producir cuerpos fructíferos vistosos y bien desarrollados y su presencia en el campo está condicionada principalmente por la humedad producida por suficiente pluviometría y por una adecuada temperatura del suelo (Lazo, 2010)

Los macrohongos, presentan una parte perenne que se sitúa en el sustrato donde se desarrollan. En la zona central de Chile se pueden encontrar desde fines de otoño hasta finales de primavera, en cambio en la zona austral es más común encontrarlos en los meses de verano, ya que la humedad excesiva destruye los carpóforos (Lazo, 2001). Estos hongos han sido estudiados principalmente con fines medicinales (Altuner y Akata, 2010; Barros *et al.*, 2007; Imtiaj y Lee, 2007; León *et al.*, 2008; Lindequist *et al.*, 2005; Paccola *et al.*, 2001).

Dentro de las investigaciones realizadas se han descubierto compuestos, llamados estrobirulinas, que son sustancias derivadas del macrohongo llamado *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Singer. De estas sustancias se han desarrollado fungicidas reconocidos y comercializados a nivel mundial como por ejemplo: azoxystrobin, kresoxim-metil, trifloxystrobin y pyraclostrobin, distribuidos por importantes empresas del rubro de los agroquímicos. Dependiendo de su forma de acción estos fungicidas son capaces de controlar enfermedades en sus primeros estados y además inhiben la germinación de conidias, controlan la movilidad de zoosporas y son efectivos en el control de varias enfermedades (Bartlett *et al.*, 2002).

Con respecto al control de hongos fitopatógenos, se han realizado algunas investigaciones con extractos de macrohongos con promisorios resultados; por ejemplo se determinó la inhibición de *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. y *Fusarium moniliforme* Sheld. con extractos de *Clitocybe odora* (Bull.: Fr.) en donde extractos con los solventes cloroformo y acetona inhibieron el crecimiento de micelio de los patógenos en aproximadamente un 30% (Türkoğlu *et al.*, 2011). También se han obtenido inhibiciones en el crecimiento del micelio de *B. cinerea* con extractos de *Lentinula edodes* (Berk.) Plegler (Ngai, 2003), conocido popularmente como Shiitake, que es utilizado principalmente en culturas orientales como alimento por su excelente sabor y además por sus propiedades, entre ellas antitumorales y su capacidad de disminuir el colesterol. Estudios realizados por Suay *et al.* (2000), mostraron buenos resultados de extractos de macrohongos en la acción antimicrobial de: *Aspergillus fumigatus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecium*, *Mycobacterium simegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Sacharomyces cerevisiae* y *Staphylococcus aureus*.

Por otro lado, es importante señalar que existen reportes que dan cuenta de una gran cantidad de metabolitos secundarios en la estructura de basidiomicetes (Brizuela *et al.*, 1998) y entre éstos se ha encontrado que algunos tienen actividad antifúngica, pero existen a la fecha muy pocos estudios que evalúen el potencial que tendrían las especies de macrohongos presentes en el país.

Como ya se ha mencionado la industria frutícola se enfrenta cada vez a más problemas por la cantidad de residuos presentes en la fruta y además por las resistencias a fungicidas en los fitopatógenos que productos químicos podrían producir al ser mal utilizados. Los extractos naturales de plantas y macrohongos podrían ser una herramienta muy útil en el control de enfermedades de forma natural y amigable con el medio ambiente, por lo que es necesario aislar e identificar los compuestos activos presentes en ellos, además de considerar los cambios moleculares, morfológicos y bioquímicos que estos compuestos causan sobre los patógenos y los hospederos (Hernández *et al.*, 2007).

Dada la información anterior se proponen la siguiente hipótesis y objetivos:

Hipótesis:

Los extractos de macrohongos inhiben el desarrollo de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* y disminuyen la incidencia de las pudriciones que estos causan en uva de mesa.

Objetivos:

- Determinar la efectividad *in vitro* de extractos de 15 macrohongos sobre el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*.
- Determinar la efectividad *in vivo*, de los 5 extractos de macrohongos más efectivos *in vitro*, en la inhibición de las pudriciones causadas por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en uva de mesa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de estudio

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de Postcosecha, del Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

### Obtención de cepas de los patógenos

Los aislados de los fitopatógenos, *Botrytis cinerea* cepa Bt2 y *Penicillium expansum* cepa C3, causantes de las enfermedades pudrición gris y moho azul en uva de mesa, respectivamente, fueron obtenidos del cepario del laboratorio antes mencionado, estos fueron previamente aislados desde uvas sintomáticas en poscosecha. Se repicaron en placas de Petri conteniendo agar papa dextrosa (APD) y se mantuvieron en condiciones controladas a una temperatura de 20°C. En pruebas preliminares se determinó que las cepas son sensibles a los fungicidas fenexamide e iprodione, fungicidas utilizados como patrones de comparación en las pruebas *in vivo* para *B.cinerea* y *P expansum*, respectivamente.

### Obtención de extractos alcohólicos a partir de macrohongos

Se colectaron fructificaciones de 15 especies de macrohongos desde su ambiente natural (Cuadro 1). Los carpóforos fueron secados en estufa de aire (modelo ULE-800, Memmert, Alemania) a 50°C hasta que se eliminó completamente la humedad. Posteriormente, 10 g de materia seca del producto obtenido se trituraron en un molino de cuchillas, los que luego se maceraron en 100 ml de etanol al 95% v/v durante 48 horas, de acuerdo con la metodología propuesta por Stadnik (2003). El material se filtró por un cono de papel filtro para retirar las partículas sólidas, luego fue secado en estufa a 50°C hasta eliminar el

solvente. El material resultante se disolvió en 3 ml de etanol al 10% v/v resultando el extracto del macrohongo. Los extractos fueron almacenados a temperaturas de 2 a 4°C.

Cuadro 1. Especies de macrohongos utilizadas para la producción de extractos, lugar de recolección y sustrato de origen de la muestra.

<b>Especie de macrohongo</b>	<b>Lugar de colección</b>	<b>Sustrato</b>
<i>Agaricus</i> sp.*	Campus Antumapu, U. de Chile región Metropolitana	Prado
<i>Agaricus xanthodermus</i> Genevier.	Campus Antumapu, U. de Chile región Metropolitana	Prado
<i>Amanita</i> sp.	Campo experimental Pantanillo, Universidad de Chile, región del Maule	Asociado a pino
<i>Bjerkandera adusta</i> (Willd.) P. Karst.	Cerro San Cristóbal, región Metropolitana	Madera muerta
<i>Calvatia cyathiformis</i> (Bosc) Morgan	Rosario, región de O'Higgins	Suelo, pastizal
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill	El Monte, región Metropolitana	Madera muerta
<i>Macrolepiota rhacodes</i> (Vittad) Singer	Rosario, región de O'Higgins	Asociado a pino
<i>Paxillus panuoides</i> (Fr.) Fr.	Rosario, región de O'Higgins	Tronco conífera
Agarical sp.	Rosario, región de O'Higgins	Tronco de kiwi
<i>Russula nothofaginea</i> Singer	Campo experimental Pantanillo, Universidad de Chile, región del Maule	Asociado a pino
<i>Suillus granulatus</i> (L.) Roussel	Campo experimental Pantanillo, Universidad de Chile, región del Maule	Asociado a pino
<i>Suillus luteus</i> (L.) Roussel	Campus Antumapu, U. de Chile, región Metropolitana	Asociado a pino
<i>Tricholoma scalpturatum</i> (Fr.) Quélet	Campus Antumapu, U. de Chile, región Metropolitana	Asociado a pino
<i>Tricholomataceae</i>	Rosario, región de O'Higgins	Madera muerta

\*Los hongos fueron determinados por Pablo Sandoval, investigador del laboratorio de Fitopatología de Poscosecha de la Facultad de Ciencias Agronómicas.

**Determinación *in vitro* de la actividad inhibitoria de extractos de macrohongos sobre el crecimiento miceliar y la germinación de conidias de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*.**

Para verificar la actividad antifúngica de los extractos de macrohongos, sobre *B. cinerea* y *P. expansum*, se enmendó APD con los extractos de macrohongos al 1% y se depositó en placas de Petri, además se dejó un testigo en APD sin enmendar, y un testigo en APD enmendado con alcohol al 10% para determinar la existencia de un posible efecto del alcohol en el crecimiento de los patógenos. Para evaluar la inhibición en el crecimiento del micelio se procedió de la siguiente forma: con una aguja de disección se seleccionaron discos de micelio de 4 mm. de diámetro de cultivos puros en APD de 7 días de edad de cada patógeno, y se dispusieron en el centro de cada placa, las cuales se incubaron a 20 ° C por tres días para *B. cinerea* y por cinco días para *P. expansum*, tiempos a partir de los cuales se procedió a medir el diámetro de crecimiento del micelio con un pie de metro (promedio de dos diámetros transversales).

Además, se determinó la inhibición de la germinación conidial de 12 de los 15 extractos estudiados, debido a no poder disponer de suficiente materia prima de los extractos de *Amanita* sp., *Suillus granulatus* y *Russula nothofaginea*. Para ello se incorporaron los extractos al medio de la misma forma que para la inhibición del crecimiento del micelio, pero se depositó en el medio solidificado una alícuota de 50 µl de una suspensión conidial de 10<sup>5</sup> conidias por mL de *B. cinerea* y *P. expansum*. Las placas así sembradas fueron incubadas a 20°C por 18 horas. La evaluación del efecto sobre la germinación se efectuó por observación microscópica de 100 conidias por cada placa. Se consideró como conidia germinada a aquella en que el crecimiento del tubo germinativo superaba dos veces el tamaño de la conidia.

### **Determinación *in vivo* de la actividad inhibitoria del extracto de 5 macrohongos.**

Luego de determinar la capacidad inhibitoria *in vitro* de los extractos, se seleccionaron los 5 extractos de macrohongos que presentaron mayor actividad y se procedió a evaluar su efecto *in vivo*, sobre bayas.

La actividad inhibitoria de los extractos sobre las pudriciones inducidas por *B. cinerea* y *P. expansum* se efectuó en bayas de vid del cv. Red Globe. La metodología utilizada consistió en la utilización de cajas plásticas transparentes, con papel absorbente húmedo en la base, luego se puso el fondo de una placa de Petri de vidrio, desinfectada con alcohol al 75%. En la placa se pusieron 3 bayas de uva, aparentemente sanas y previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5% durante 2 minutos, estas fueron inmovilizadas con papel adhesivo doble faz. A cada baya se le realizó una herida de 1 mm de diámetro y 3 mm de profundidad con una aguja de disección sobre la cual se aplicaron 20 µl de cada tratamiento (Cuadro 2).

Cuadro 2: Tratamientos realizados *in vivo* para determinar el efecto de los extractos sobre el desarrollo de las pudriciones inducidas por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, en bayas de vid cv. Red Globe inoculadas con heridas.

Tratamiento
Etanol al 10%
Teldor 50% WP* (80g/hL) / Tercel 50% WP**
Testigo inoculado
Testigo sin inocular
Extracto de macrohongo
Extracto de macrohongo sin inocular

\*/ \*\*: Tratamientos fungicidas tradicionales para el control de *B. cinerea* y *P. expansum*, respectivamente.

La suspensión conidial de cada patógeno se inoculó una hora después de la aplicación de los tratamientos, depositando 10 µl de una suspensión de  $1 \times 10^5$  conidias\* mL<sup>-1</sup>. Las bayas se incubaron a 20°C y se hizo un seguimiento cada 24 horas para ver la progresión de la infección sobre las bayas hasta llegar a los 5 días donde se evaluó, midiéndose los

diámetros de la pudrición alcanzada en cada tratamiento y se comparó con los diámetros alcanzados en el testigo inoculado, para obtener los porcentajes de inhibición de los extractos analizados.

En un segundo ensayo la inoculación de los patógenos fue realizada 24 horas después, con el fin de evaluar el posible efecto residual de los extractos.

Además, los ensayos se repitieron de la forma antes descrita, pero las bayas de uva que se utilizaron no fueron previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio, para verificar posibles variaciones en la severidad de las pudriciones al desinfectar las bayas antes de aplicar los tratamientos.

## DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el ensayo *in vitro* se utilizó un modelo de aleatorización completa con 4 repeticiones, cada repetición en una placa diferente. Los porcentajes de inhibición que se obtuvieron del crecimiento radial de *B. cinerea* y *P. expansum* se transformaron a rangos antes de ser sometidos a un Análisis de varianza (ANDEVA), y posteriormente las medias fueron separadas mediante el test LSD de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

Para valorar el efecto inhibitorio de los extractos en el ensayo *in vivo*, se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 4 repeticiones. La unidad experimental fueron cajas plásticas transparentes con 3 bayas. Los diámetros de pudrición se transformaron a rangos antes de ser sometidos a un ANDEVA y luego las medias fueron separadas mediante el test LSD de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Determinación *in vitro* de la actividad inhibitoria de extractos de macrohongos sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidias de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*.**

Al comparar el crecimiento del micelio en las placas de APD (testigo), con el crecimiento obtenido en las placas enmendadas con alcohol al 10%, no hubo diferencias estadísticamente significativas, por lo que se asume que el alcohol diluido en el que fueron recuperados los extractos no tendría influencia alguna en el crecimiento de los patógenos.

### **Inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea***

Los extractos analizados presentaron diferentes niveles de inhibición, el mayor nivel se obtuvo con los extractos de *S. luteus*, *Agarical sp.* y *Amanita sp.* que alcanzaron inhibiciones de 92,8, 71,0 y 69,4%, respectivamente, al ser comparadas con el crecimiento micelial del testigo, ejerciendo una efectiva disminución del crecimiento del micelio a nivel *in vitro* (Cuadro 3 y Figura 1). Estudios realizados por (Nieto y Ávila, 2008) indican que cepas silvestres de *Suillus sp.* producen metabolitos secundarios con una alta capacidad antioxidante, pero a diferencia de los resultados del presente estudio, no encontraron actividad antimicrobiana en *S. luteus*, en cambio *S. lakei* inhibió el crecimiento de *Sporothrix schenkii* Hektoen y Perkin (González *et al.*, 2009). Con respecto a *Agarical sp.*, se han encontrado especies del mismo orden que presentan actividad antibacteriana (Suay *et al.*, 2000), pero a diferencia de este estudio no se encontró actividad antifúngica. Los datos correspondientes a *Amanita sp.* concuerdan con los obtenidos por Domínguez, (2013) quien evaluó la actividad antifúngica de extractos de *Amanita muscaria* (L) Lam. sobre *B. cinerea*, obteniendo inhibiciones cercanas al 25%.

En un segundo nivel de significancia se presentaron los extractos de *A. arvensis* y *C. cyathiformis*, que inhibieron el crecimiento micelial en un 63,7 y 46,2%, respectivamente.

Estudios realizados con extractos del género *Calvatia*, lograron inhibiciones de *B. cinerea* cercanas al 30% (Imtiaj y Lee, 2007). Al respecto es importante señalar que 4 de los 15 extractos analizados alcanzaron inhibiciones por sobre el 50% del crecimiento del micelio, porcentajes inferiores a los obtenidos en este estudio.

En un tercer nivel se presentaron los extractos de *T. scalpturatum*, *S. granulatus* y *B. adusta*, que inhibieron entre un 29,4 y un 23,4%. Los extractos de los restantes macrohongos provocaron inhibiciones que fluctuaron solamente entre un 19,4 y un 5,6%. (Cuadro 3).

Si bien los resultados son variables, cabe destacar que todos los extractos de macrohongos analizados tuvieron algún efecto sobre el crecimiento del micelio del patógeno, por lo que sería de gran importancia seguir estudiando los extractos de estas y otras especies fúngicas.

Cuadro 3. Inhibición *in vitro* del crecimiento miceliar de *Botrytis cinerea* en APD enmendado con extractos de macrohongos.

Macrohongos	% inhibición	
<i>Suillus luteus</i>	92,8	a*
Agarical sp.	71,0	a b
<i>Amanita sp.</i>	69,4	a b
<i>Agaricus arvensis</i>	63,7	b
<i>Calvatia cyathiformis</i>	46,2	b
<i>Tricholoma scalpturatum</i>	29,4	c
<i>Suillus granulatus</i>	29,0	c
<i>Bjerkandera adusta</i>	23,4	c d
Tricholomataceae	19,4	d
<i>Laetiporus sulphureus</i>	18,6	d
<i>Agaricus xanthodermus</i>	17,8	d
<i>Macrolepiota rhacodes</i>	16,6	d e
<i>Agaricus sp.</i>	12,1	d e
<i>Paxillus panuoides</i>	10,6	e
<i>Russula nothofaginea</i>	5,6	e

\*Letras iguales en la columna indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos, las medias fueron separadas con la Prueba de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

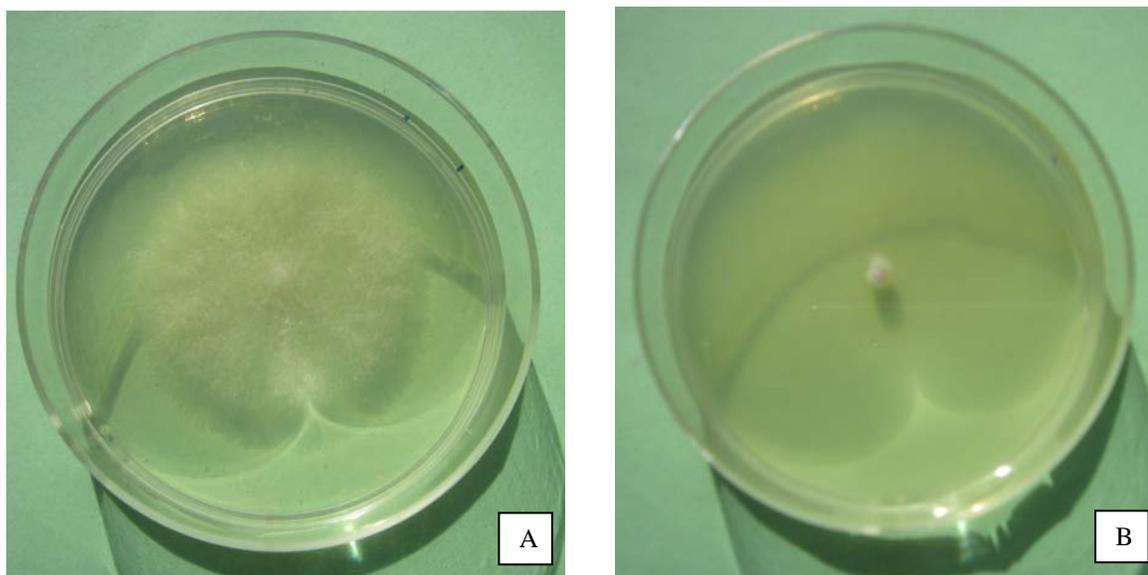


Figura 1. A; crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* en PDA (testigo): B; crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* en medio con extracto de *Suillus luteus*.

### **Inhibición de la germinación de conidias de *Botrytis cinerea***

Los extractos que provocaron una mayor inhibición de la germinación de conidias fueron Agarical sp., *M. rhacodes* y *C. cyathiformis* con un 54,6, 28,8% y 17%, respectivamente. En un nivel intermedio de inhibición se ubicaron los extractos de *P. panuoides*, *B. adusta*, *T. scalpturatum* y Tricholomataceae con inhibiciones entre 13,0 y 7,8%, mientras que los demás extractos presentaron un nivel más bajo de inhibición, con porcentajes que variaron entre un 7,0 y un 5,4% (Cuadro 4).

Los niveles de inhibición fueron menores que para el crecimiento miceliar, y a excepción de Agarical sp. (Figura 2) los extractos de macrohongo más efectivos fueron diferentes a los más eficientes para la inhibición del micelio.

En Chile existen pocos antecedentes respecto de evaluación del efecto de extractos de macrohongos sobre la inhibición de la germinación de conidias de hongos, y en el único desarrollado no se detectó inhibición de la germinación, pero si en el crecimiento del tubo

germinativo, observándose que extractos de *Russula sardonia* Fr., *Scleroderma* sp. *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. y *Bjerkandera adusta*, afectaron el grosor, largo y número de tubos germinativos de las conidias de *B. cinerea* (Domínguez, 2013),

Cuadro 4. Efecto de los extractos de macrohongos en la inhibición de la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*.

Extractos	Inhibición de germinación
Agarical sp	54,6 a*
<i>Macrolepiota rhacodes</i>	28,8 a
<i>Calvatia cyathiformis</i>	17,0 b
<i>Paxillus panuoides</i>	13,0 b
<i>Bjerkandera adusta</i>	10,0 b
<i>Tricholoma scalpturatum</i>	9,4 b c
Tricholomatacea	7,8 b c
<i>Agaricus arvensis</i>	7,0 c
<i>Agaricus sp</i>	6,4 c
<i>Laetiporus sulphureus</i>	6,2 c
<i>Agaricus xanthodermus</i>	5,6 c
<i>Suillus luteus</i>	5,4 c

\*Letras iguales en la columna indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos, las medias fueron separadas con la Prueba de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

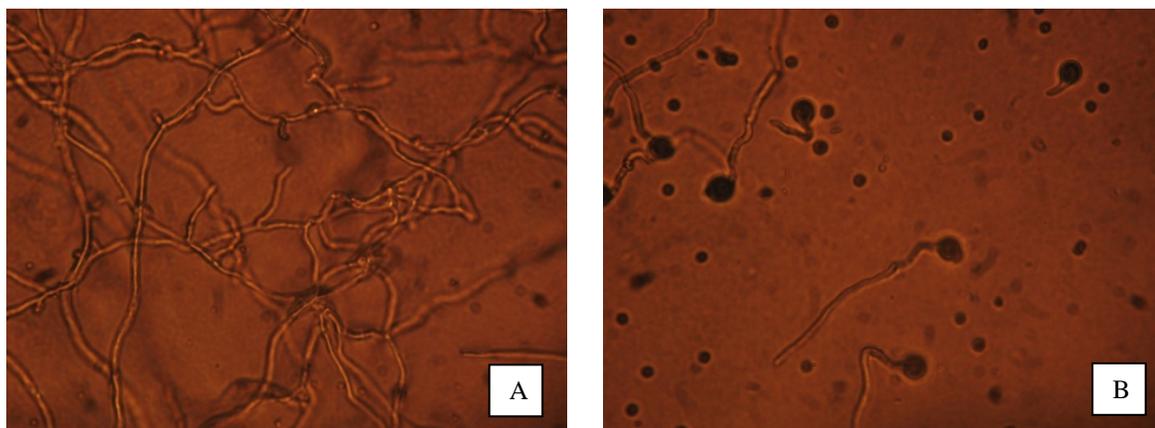


Figura 2. A; germinación de conidias de *Botrytis cinerea* en PDA (testigo); B; germinación de conidias de *Botrytis cinerea* en medio con extracto de Agarical sp.

### **Inhibición del crecimiento miceliar de *Penicillium expansum***

Los niveles de inhibición del crecimiento miceliar de *P. expansum* no superaron el 36%, muy distinto a lo observado anteriormente para el caso de *B. cinerea*, además sólo 12 de los 15 extractos presentaron algún efecto sobre el crecimiento del micelio, los tres restantes fueron estadísticamente iguales al testigo (Cuadro 5).

Los extractos de Agarical sp. (Figura 3) y *A. arvensis* mostraron los mayores porcentajes de inhibición llegando a un 35,3 y 34,5%, respectivamente, luego los extractos de *S. luteus*, *C. cyathiformis*, *L. sulphureus* y Tricholomataceae, produjeron una inhibición que fluctuó entre un 29,9 y un 25,7%. Los extractos restantes presentaron niveles de inhibición de un 23,3% o menores. Los extractos de *S. granulatus*, *Amanita* sp. y *R. nothofaginea*, no inhibieron el crecimiento miceliar del patógeno.

Los extractos más efectivos en la inhibición del crecimiento miceliar de *P. expansum* fueron prácticamente los mismos que presentaron la mayor efectividad sobre *B. cinerea* a excepción de *L. sulphureus*, que en este caso tuvo una mayor actividad sobre el patógeno.

Cuadro 5. Inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de *Penicillium expansum* en APD enmendado con extractos de macrohongos.

Macrohongos	% Inhibición
Agarical sp.	35,3 a*
<i>Agaricus arvensis</i>	34,5 a
<i>Suillus luteus</i>	29,9 b
<i>Calvatia cyathiformis</i>	28,3 b c
<i>Laetiporus sulphureus</i>	26,1 c
Tricholomatacea	25,7 c d
<i>Agaricus xanthodermus</i>	23,3 d
<i>Macrolepiota rhacodes</i>	18,9 e
<i>Tricholoma scalpturatum</i>	17,7 e f
<i>Agaricus sp.</i>	13,0 f
<i>Bjerkandera adusta</i>	12,9 f
<i>Paxillus panuoides</i>	4,9 g
<i>Suillus granulatus</i>	0,0 h
<i>Amanita sp.</i>	0,0 h
<i>Russula nothofaginea</i>	0,0 h

\*Letras iguales en la columna indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos, las medias fueron separadas con la Prueba de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

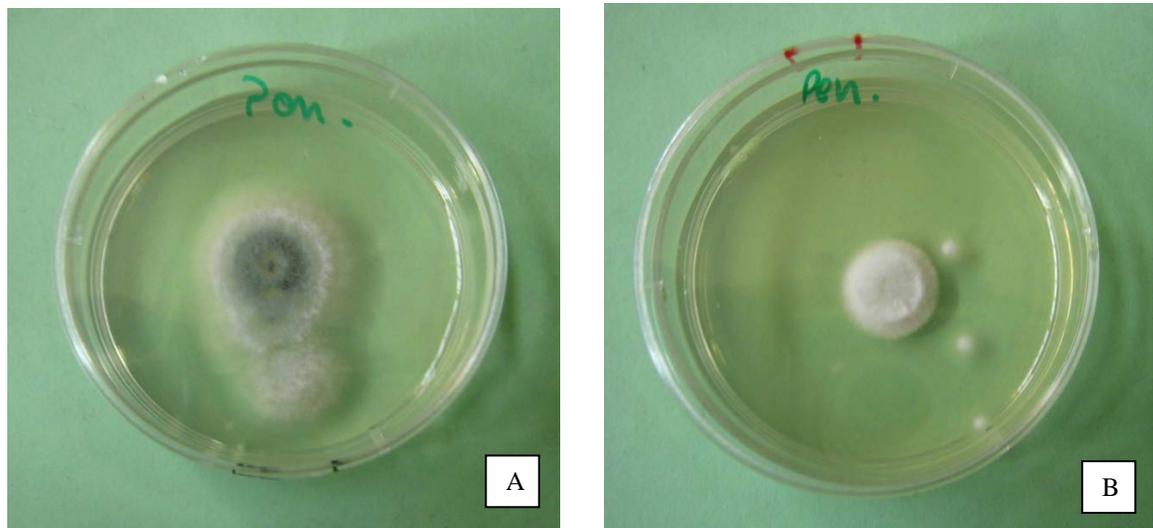


Figura 3. A; crecimiento de micelio de *Penicillium expansum* en PDA (testigo): B; crecimiento de micelio de *Penicillium expansum* en medio PDA con extracto de Agarical sp.

### **Inhibición de la germinación de conidias de *Penicillium expansum***

Los extractos que presentaron un mayor efecto en la inhibición de la germinación de las conidias fueron *A. arvensis* (Figura 4) y *L. sulphureus*, con 87,0 y 71,0%, respectivamente. Estos valores son muy superiores al efecto obtenido sobre el crecimiento micelial del mismo patógeno, en donde la mayor inhibición fue cercana al 35% (Cuadro 6).

Este resultado es muy interesante ya que no existen reportes previos de que extractos de *L. sulphureus* presenten un efecto inhibitorio de la germinación de conidias de hongos fitopatógenos, pero sí sobre bacterias Gram (-) y sobre otros hongos como *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout, causante de enfermedades en humanos (Turkoglu *et al.*, 2007).

Dentro de los estudios realizados en extractos de macrohongos no se encontraron antecedentes de control de *P. expansum*, sin embargo sí se ha determinado que algunos de los productos químicos a base de estrobirulinas como azoxystrobin, kresoxim metil, trifloxystrobin y pyraclostrobin son capaces de inhibir la germinación, crecimiento del tubo germinativo y además inhiben la movilidad de zoosporas de algunos hongos (Bartlett *et al.*, 2002), por lo que es posible que sustancias no estudiadas, presentes en los cuerpos fructíferos de los hongos evaluados, puedan inhibir la germinación de conidias.

Cuadro 6. Inhibición de la germinación de conidias de *Penicillium expansum* en APD enmendado con extractos de macrohongos.

Extractos	Inhibición de germinación (%)
<i>Agaricus arvensis</i>	87,0 a*
<i>Laetiporus sulphureus</i>	71,0 a b
<i>Agaricus sp.</i>	57,6 b
<i>Suillus luteus</i>	46,6 b c
<i>Agaricus xanthodermus</i>	25,2 c
<i>Calvatia cyathiformis</i>	5,6 d
Agarical sp.	4,4 d
<i>Bjerkandera adusta</i>	4,4 d
<i>Paxillus panuoides</i>	3,2 e
<i>Tricholomatacea</i>	3,0 e
<i>Macrolepiota rhacodes</i>	2,8 e
<i>Tricholoma scalpturatum</i>	0,8 f

\*Letras iguales en la columna indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos, las medias fueron separadas con la Prueba de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

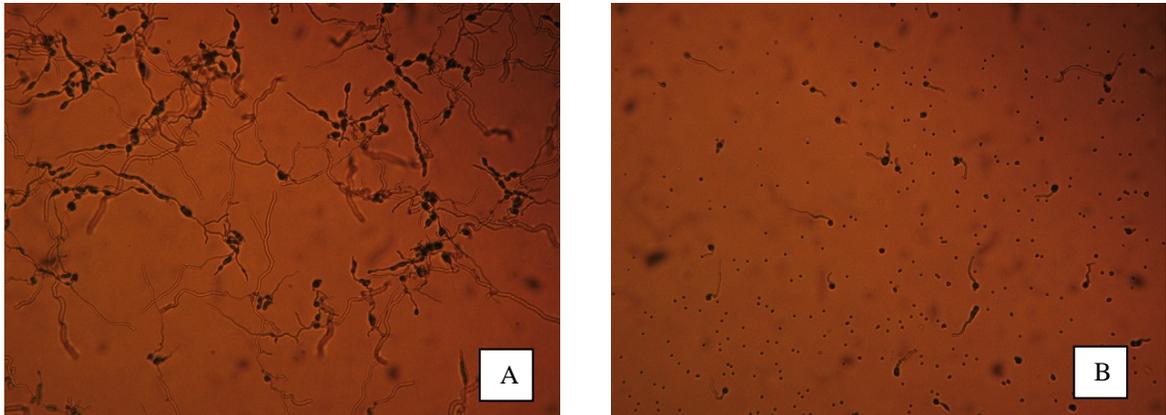


Figura 4. A: Germinación de conidias de *Penicillium expansum* en medio APD (testigo). B; Germinación de conidias en medio enmendado con extracto de *Agaricus arvensis*, aspecto presentado 24 horas post-siembra.

### **Determinación *in vivo* de la actividad inhibitoria del extracto de 5 macrohongos seleccionados**

De los 15 extractos utilizados durante la determinación de la inhibición del crecimiento del micelio de *B. cinerea*, se seleccionaron para la fase *in vivo* los extractos de *Agaricus arvensis*, *Amanita sp.*, *Calvatia cyathiformis*, *Agarical sp.* y *Suillus luteus*.

#### **Actividad de extractos en bayas desinfectadas e inoculadas con *Botrytis cinerea*.**

Solo el extracto de *Amanita sp.* inhibió el desarrollo de la infección al inocular las bayas 24 horas después de ser aplicado el extracto (Cuadro 7). Ninguno de los tratamientos redujo la pudrición de las bayas cuando fueron inoculadas 1 hora después de ser tratadas con los extractos de macrohongos.

Al aplicar el extracto de *S. luteus* se observó un mayor desarrollo de la infección en las bayas tratadas (1 y 24 horas post-aplicación), que en el testigo. Este comportamiento podría sugerir que el extracto podría favorecer el desarrollo de la infección. Los extractos de *A. arvensis*, *C. cyathiformis* y *Agarical sp.* no fueron efectivos en la inhibición del avance de la pudrición.

Cuadro 7. Diámetro de la lesión causada por *B. cinerea* (mm) en bayas de vid del cultivar Red Globe, previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5% y tratadas con los extractos de macrohongos 1 o 24 horas antes de la inoculación.

Tratamientos	<i>A. arvensis</i>	<i>Amanita sp.</i>	<i>C. cyathiformis</i>	<i>Agarical sp.</i>	<i>S. luteus</i>
1 hora	15,4 a*	11,5 b	19,8 a	18,2 a	18,4 b
24 horas	16,5 a	8,0 a	19,9 a	18,5 a	17,1 b
Testigo inoculado	16,5 a	12,0 b	21,5 a	19,9 a	16,5 a

\*Letras iguales en la columna indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos, las medias fueron separadas con la Prueba de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

#### **Actividad de extractos en bayas sin desinfectar inoculadas con *Botrytis cinerea*.**

El extracto de *Amanita sp.*, al igual que en el ensayo anterior con bayas desinfectadas, provocó un menor desarrollo de la enfermedad en bayas inoculadas 24 horas después de

ser tratadas con el extracto, la aplicación del extracto 1 hora antes de la inoculación no presentó diferencias con el testigo. Los extractos de *C. cyathiformis*, *Agarical sp.* y *S. luteus* no presentaron inhibición del desarrollo de la enfermedad. Muy distinto a lo reportado por Domínguez (2013), donde al usar los extractos de los macrohongos *Rhizopogon roseolus* y *Stereum hirsutum*. observó inhibiciones muy similares al fungicida fenexamide a dosis comercial, mientras que los extractos de *Scleroderma sp.* y *R. sardonía* presentaron porcentajes de inhibición de un 13 y 19%, respectivamente.

Cuadro 8. Diámetro (mm) de pudrición gris causada por *Botrytis cinerea* en bayas de vid del cultivar Red Globe sin desinfectar, tratadas 1 o 24 horas antes de la inoculación.

Tratamientos	<i>A. arvensis</i>	<i>Amanita sp.</i>	<i>C. cyathiformis</i>	<i>Agarical sp.</i>	<i>S. luteus</i>
1 hora	15,4 b*	9,5 b	16,2 a	14,4 a	12,8 a
24 horas	13,7 a	7,7 a	16,0 a	14,2 a	13,0 a
Testigo inoculado	13,2 a	10,8 b	15,9 a	13,8 a	13,2 a

\*Letras iguales en la columna indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos, las medias fueron separadas con la Prueba de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

#### **Actividad de extractos en bayas desinfectadas inoculadas con *Penicillium expansum*.**

Los extractos utilizados fueron: *Agarical sp.*, *Agaricus arvensis*, *Suillus luteus*, *Calvatia cyathiformis* y *Laetiporus sulphureus*. Adicionalmente se incluyó el extracto de *Amanita sp.*, ya que fue el único en inhibir el desarrollo de la pudrición inducida por *B. cinerea*.

Sólo el extracto de *Amanita sp.* produjo una disminución en el desarrollo de la pudrición cuando fue aplicado tanto 1 como 24 horas antes de la inoculación en comparación con el testigo, similar a los resultados obtenidos en bayas inoculadas con *B. cinerea*. Los demás tratamientos no inhibieron el desarrollo del moho azul (Cuadro 9).

Cuadro 9. Diámetro (mm) de pudrición causada por *Penicillium expansum* en bayas de vid del cultivar Red Globe, tratadas 1 o 24 horas antes de la inoculación.

Tratamientos	<i>A. arvensis</i>	<i>Amanita sp.</i>	<i>C. cyathiformis</i>	Agarical sp.	<i>S. luteus</i>	<i>L. sulphureus</i>
1 hora	15,8 a*	14,5 a	19,7 a	20,9 a	15,9 a	15,5 a
24 horas	16,2 a	13,6 a	19,0 a	19,6 a	15,7 a	16,0 a
T. inoculado	15,9 a	16,5 b	20,0 a	20,0 a	15,9 a	15,8 a

\*Letras iguales en la columna indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos, las medias fueron separadas con la Prueba de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

#### **Actividad de extractos en bayas sin desinfectar inoculadas con *Penicillium expansum*.**

A diferencia de lo observado en el ensayo anterior, los extractos de macrohongos utilizados no presentaron efecto en el control del patógeno, el avance de la enfermedad fue estadísticamente similar en todos los tratamientos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Diámetro (mm) de pudrición (moho azul) causada por *Penicillium expansum* en bayas de vid del cultivar Red Globe, previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5% y tratadas 1 o 24 horas antes de la inoculación.

Tratamiento	<i>A. arvensis</i>	<i>Amanita sp.</i>	<i>C. cyathiformis</i>	Agarical sp.	<i>S. luteus</i>	<i>L. sulphureus</i>
1 hora	10,2 a*	12,7 a	16,2 a	15,2 a	11,1 a	13,6 a
24 horas	9,9 a	11,8 a	15,5 a	14,7 a	11,1 a	14,1 a
T. inoculado	11,6 a	13,1 a	16,5 a	15,7 a	11,6 a	13,5 a

\*Letras iguales en la columna indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos, las medias fueron separadas con la Prueba de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

En el desarrollo de este trabajo las bayas no se vieron afectadas por daños fitotóxicos al ser tratadas con los extractos de macrohongos, sin embargo en ensayos realizados anteriormente en el laboratorio de Fitopatología de Postcosecha, algunos extractos utilizados resultaron ser fitotóxicos, afectando visiblemente hojas de tomate al ser utilizados para el control de oídio, y en hojas de nogal, como control de peste negra (Domínguez, 2013),

Se ha demostrado que existe actividad inhibitoria de los extractos de macrohongos a nivel *in vitro*, lo que implica un gran potencial de éstos para el control de los patógenos analizados, así como también en la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Pierce) Vauterin *et al.* (Domínguez, 2013).

A pesar de los buenos resultados obtenidos a nivel *in vitro*, no se logró controlar la infección a nivel *in vivo*, lo que podría ser resultado de una metodología muy agresiva, ya que al producir una herida en la baya, los patógenos se encuentran en un ambiente favorable y son capaces de penetrar por áreas de la lesión que quedan menos protegidas.

También es importante tener en cuenta algunos aspectos respecto a los macrohongos, ya que podrían tener efectos nocivos para la salud, es el caso de *Amanita* sp., ya que si bien en este trabajo se han encontrado buenos resultados, cabe mencionar que dentro de este género se encuentran especies con gran cantidad de compuestos tóxicos y alucinógenos (Li y Oberlies, 2005), por lo que es necesario hacer un análisis más exhaustivo de ese extracto, ya que los compuestos que afectan en este caso a *B. cinerea* podrían ser traspasados a la fruta aplicada y ser perjudiciales para la salud.

Aun existen muchas interrogantes que deben resolverse respecto de los extractos de macrohongos y su eficacia en el control de pudriciones de *B. cinerea*, *P. expansum* u otros, como por ejemplo dosis más efectivas, estudiar el o los solventes mas adecuados para la extracción de metabolitos de cada especie de macrohongo, el efecto de mezclas de extractos, entre otras. En búsqueda de nuevas alternativas a los fungicidas utilizados actualmente.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a la metodología y los resultados obtenidos en el presente estudio es posible concluir que:

- Todos los extractos de macrohongos analizados, inhiben el crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea*.
- El efecto de los extractos de macrohongos sobre la germinación conidial de *Botrytis cinerea*, es inferior al efecto sobre el crecimiento miceliar.
- Solo 12 de los 15 extractos presentan algún nivel de control *in vitro* sobre *Penicillium expansum*. Sin embargo, a diferencia de lo detectado en *Botrytis cinerea*, los extractos tienen un mayor efecto sobre la germinación conidial que sobre el crecimiento miceliar del patógeno.
- Sólo el extracto de *Amanita* sp, inhibe el desarrollo de las infecciones, provocadas artificialmente por ambos patógenos, en bayas de vid.
- Los resultados obtenidos en este estudio solo permiten comprobar parcialmente la hipótesis planteada, ya que sí bien los extractos inhiben el crecimiento de micelio y la germinación de conidias, éstos no fueron capaces de inhibir las infecciones en bayas de vid.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, A y R. Pérez 2008, abr.-jun. La contaminación agrícola del agua en México: retos y perspectivas. *Revista Latinoamericana de Economía*, 39(153): 205-215.
- Agrios, G. 2004. Plant pathology. Elsevier Academic Press. Florida. 903p.
- Alcalá de Marcano, D.; N. Vargas y A. Pire. 2005. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. *Revista Facultad de Agronomía*, 22(4): 315-323.
- Altuner, E. e I. Akata. 2010. Antimicrobial activity of some macrofungi extracts. *SAÜ. Fen Bilimleri Dergisi*, 14(1): 45-49.
- Álvarez, M. 1989. Resistencia a fungicidas, fundamentos y aspectos prácticos (pp.125-138). En: Latorre, B. (ed.). Fungicidas y nematocidas avances y aplicabilidad. Santiago. Chile. Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile. 216p.
- Alzate, N.; V. López; H. Marín y A. Murillo. 2009. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, *Myrtaceae*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, *Rutaceae*) sobre algunos hongos filamentosos. *Revista Tumbaga*, 1(4): 59-71.
- Bartlett, D.; J. Clough; J. Bodwin; A. Hall; M. Tlamer y B. Parr-Dobrzanski. 2002. Review the strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58: 649-662.
- Barros, L.; R. Calhelha; J. Vaz; I. Ferreira; P. Baptista y L Estecinho. 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of portuguese wild edible mushrooms metanolic extracts. *European Food Research and Technology*, 225: 151-156.
- Brizuela, M. A.; L. García; L. Pérez y M. Mansur. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15: 69-74.
- Carreño, I. y M. Álvarez. 1989. Razas resistentes de Botrytis cinerea en fungicidas dicarboximidas. *Aconex*, 26: 17-20.
- Codex Alimentarius. [En línea]. Estados Unidos, recuperado en: <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html?lang=es>. Consultado: 6 Enero de 2014.

Copier, Ch. 2013. Caracterización genética y fenotípica de aislados chilenos de *Botrytis cinerea* Pers. Provenientes de *Vitis vinífera* L. cv. Thompson seedless con distinto nivel de sensibilidad a estrobirulinas. Santiago. Chile. Tesis Magister en Ciencias Agronómicas e Ingeniero Agrónomo mención Sanidad Vegetal, Universidad de Chile. 35p.

De Souza, E.; C. Sayuri; G. Denobrega y L. Paccola-Meirelles. 2001. Antagonistic effect of edible mushrooms extract on *Candida albicans* growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 176-178.

Donoso, A. y B. Latorre. 2006, may.-ago. Caracterización del moho azul causado por *Penicillium spp.* en uva de mesa almacenada en frío. *Ciencia e Investigación Agraria*, 33(2): 143-155.

Domingo, D. y M. López-Brea. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4): 385-393.

Domínguez, V. 2013. Evaluación de extractos de macrohongos con acción inhibitoria de patógenos de importancia agrícola. Santiago. Chile. Tesis Magister en Ciencias Agronómicas e Ingeniero Agrónomo mención Sanidad Vegetal, Universidad de Chile. 46p.

Esterio, M.; J. Auger; C. Ramos y H. García. 2007. First report of fenhexamide resistant isolates of *Botrytis cinerea* on grapevine in Chile. *Plant Disease*, 91(6):768.

Esterio, M.; J. Auger; C. Ramos y M. J. Araneda. 2011. Botrytis en uva de mesa de exportación: PCR en tiempo real una innovadora herramienta tecnológica para la detección oportuna de resistencia a fungicidas. El fruticultor, n° 123 recuperado en: [http://www.fedefruta.cl/newsletter/123/docs/Marcela\\_Esterio\\_Botrytis.pdf](http://www.fedefruta.cl/newsletter/123/docs/Marcela_Esterio_Botrytis.pdf)

FAO (Food and Agriculture organization). [En línea]. Recuperado en <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/S>>. Consultado: 6 Enero de 2014.

Gutiérrez, S.; J. Casqueiro y J. F. Martín. 2000. Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17: 554-560.

González, P.; L. Garza; M. Salinas; L. Vera; F. Garza; X. Ramírez y O. Torres. 2009, Ene.-Mar. Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotoxicidad de dos especies mexicanas de *Suillus spp.* *Ciencia Universidad Autónoma Nueva León*, 7(1): 62-70.

Hernández, A.; S. Bautista y M. Velázquez. 2007, abr.-jun. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2): 119-123.

Intiaj, A. y Lee T. 2007. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(3): 316-321.

Lazo, W. 1990. Acción antimicrobiana de algunas plantas de uso medicinal en Chile. *Boletín Micológico*, 5(1-2): 25-28.

Lazo, W. 2001. Hongos de Chile, Atlas micológico. Santiago: Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. 231 p.

Leon, F.; I. Brovard; F. Torres; J. Quintana; A. Rivera; F. Estévez y J. Bermejo. 2008. A new ceramide from *Suillus luteus* and its cytotoxic activity against human melanoma cells. *Chemistry & Biodeversity*, 5: 120-125.

Li, C. y N. Oberlies. 2005. The most widely recognized mushrooms: chemistry of the genus *Amanita*. *Life Sciences*, 78(2005): 532-538

Lindequist, U.; F. Niedermeyer y W. Julich. 2005. The pharmacological potencial of mushrooms. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(3): 285-299.

Martínez, R.; B. Ramírez y G. Rojo. 2012. Recursos naturales y contaminación ambiental. Mochicahui. México 345p.

Montes-Belmont, R.; V. Cruz; G. Martínez; G. Sandoval; R. García; S. Zilch; L. Bravo; K. Bermúdez y E. Flores. 2000, jul.-dic. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(2): 122-131.

Muñoz, O.; M. Montes y T. Wilkomirsky. 2004. Plantas medicinales de uso en Chile. Segunda edición. Santiago, Chile. Editorial universitaria. 318p.

Nawrath, A. y J.L. Henríquez. 2008. Antecedentes sobre el moho azul de la uva de mesa causado por *Penicillium*. *Aconex*, 97: 15 – 21.

Ngai, P. 2003. Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sciences*, 73 (2003): 3363-3374.

Nieto, I. e I. Ávila. 2008. Determinación de ácidos grasos y compuestos terpenoides del cuerpo fructífero de *Suillus Luteus*. *Revista Colombiana de Química*, 37(3): 297-304.

Leporati, M.; D. Romano y P. Villalobos. 2003. (299-312). Antecedentes respecto de las interacciones entre la agricultura y los recursos naturales y el ambiente en Chile. En: Arroyo M.; J. Troncoso; J. Lerdón.; T. M. Meyer.; M. B. Marshall.; G. Donoso.; O. Melo.; A. Mac Cawley y M. Berguecio. Eds. Pensando la agricultura del 2010. Desafíos, ajustes y política. Octavo Congreso de Economistas Agrarios. (27, 28 y 29 de Octubre de 2003, Santiago. Chile. 638p.

ODEPA (oficina de estudios y políticas agrarias). [En línea]. Santiago, Chile. Recuperado en < <http://www.odepa.cl/frutales-superficie-y-produccion-2/>>. Consultado: 6 Enero de 2014.

Paccola, E.; C. Maki, G. Nobrega y L. Paccola-Meirelles. 2001. Ago-Oct. Antagonistic effect of edible mushroom extract on *Candida albicans* growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(3): 176-178.

Pérez, R. y A. Aguilar. 2012. Agricultura y contaminación del agua D.F.: Universidad nacional autónoma de México. 288 p.

Reuveni M.; J.C. Arroyo y J.L. Henríquez. 2009. A new tea tree oil-based organic fungicide for the control of grape powdery and mildews. *Phytopathology*, 99(6):S108.

Spadaro, I. 2002. Resistencia de *Botrytis cinerea* a las Anilinopirimidinas. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Departamento de fruticultura y Enología. Pontificia Universidad Católica de Chile. 76 p.

Stadnik, M.; W. Bettioli and M. Saito. 2003. Bioprospecting for plant and fungus extracts with systemic effect to control the cucumber powdery mildew. *Journal of Plant Disease and Protection*, 110(4):383-393.

Suay I.; F. Arsenal; J. Asensio; A. Basilio; M. A. Cabello; M. T. Díez; J. B. García; A. González del Val; J. Gorrochategui; P. Hernández; F. Peláez y M.F. Vicente. 2000. Screening of basidiomicetes for antifungal activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 129-139.

Türkoglu, A.; P. Guler; A. Araz; F. Kutluer y I. Kunduz. 2011. Antifungal effects of *Clitocybe odora* (Bull. Fr) Kum. against the plant pathogens, *Fusarium culmorum* and *Fusarium moniliforme*. *Haceteppe The Journal of Biological Chemistry*, 39 (1): 5-60.