

Actividad antifúngica de bioinsumos de origen botánico sobre *Botrytis cinerea* Whetzel

Antifungal activity of bioinputs of botanical origin of *Botrytis cinerea* Whetzel

María Cristina Sandoval¹, María Sol Gilardino¹, Florencia Ofelia Ameri¹⁻², Mónica Beatriz Barrios¹

mariacristinasandoval2@gmail.com, mariasolgilardino@gmail.com, monicabarrios4@yahoo.com.ar, florenciaameri@abc.gob.ar

¹ Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Buenos Aires. Argentina

² Becaria EVC-CIN

Recibido 20/12/2023; Aceptado: 01/02/2024

Resumen: El moho gris causado por *Botrytis cinerea* es una de las enfermedades fúngicas más destructivas que afecta a un amplio rango de hospedantes. La utilización de fungicidas de síntesis química ha generado problemas de resistencia y su uso indiscriminado tiene efectos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente. Ante esta situación problemática se observa un interés creciente por el estudio y uso de sustancias antifúngicas de origen vegetal consideradas seguras. En este contexto se realizó el presente trabajo con el objetivo de evaluar in vitro el efecto de tres bioinsumos de origen botánico (*Origanum vulgare* L., *Lavandula officinalis* L. y *Equisetum giganteum* L.) sobre el crecimiento y desarrollo de *B. cinerea*. Para lo cual se sembraron esclerocios y suspensiones de conidios de *B. cinerea* en placas adicionadas con los bioinsumos mencionados. La medición del diámetro de colonias y la observación de las estructuras fúngicas permitió determinar que los tres bioinsumos estimulan el desarrollo micelial de colonias desarrolladas a partir de esclerocios e inhiben la formación de conidios y esclerocios del patógeno. Por consiguiente, inhiben el principal mecanismo de diseminación (conidios) y sobrevivencia del patógeno (esclerocios).

Palabras-clave: Bioinsumos; Moho gris; Orégano; Lavanda; *Equisetum*.

Abstract: Gray mold caused by *Botrytis cinerea* is one of the most destructive fungal diseases that affects a wide range of hosts. The use of chemically synthesized fungicides has generated resistance problems and their indiscriminate use has negative effects on human health and the environment. Given this problematic situation, there is a growing interest in the study and use of antifungal substances of plant origin considered safe. In this context, the present work was carried out with the objective of evaluating in vitro the effect of three bioinputs of botanical origin (*Origanum vulgare* L., *Lavandula officinalis* L. and *Equisetum giganteum* L.) on the growth and development of

B. cinerea. For which sclerotia and suspensions of conidia of *B. cinerea* were sown on plates added with the aforementioned bioinputs. The measurement of the diameter of colonies and the observation of fungal structures allowed us to determine that the three bioinsumments stimulate the mycelial development of colonies developed from sclerotia and inhibit the formation of conidia and sclerotia of the pathogen. Consequently, they inhibit the main mechanism of dissemination (conidia) and survival of the pathogen (sclerotia).

Keywords: Bioinputs; Gray mold; Marjoram; Lavender; *Equisetum*

1. Introducción

El moho gris causado por *Botrytis cinerea* ocupa el segundo lugar en importancia por sus efectos negativos sobre el rendimiento y la calidad, en el campo y en postcosecha, de distintos cultivos (Shemshaki et al., 2023). *B. cinerea* posee una amplia distribución a nivel mundial afectando más de 1000 especies de plantas de 589 géneros botánicos. Puede infectar todos los órganos de las plantas: semillas, plántulas, frutos, hojas y flores (Shemshaki, Op. Cit). La enfermedad del moho gris es particularmente devastadora en el cultivo de frutilla (Biel et al., 2023), donde puede causar pérdidas en rendimiento entre 20 a 30% y llegar al 50% en condiciones favorables para la infección (Baptista, 2012).

El ciclo de vida de *B. cinerea* consiste de cuatro estructuras morfológica y funcionalmente diferentes: ascosporas, conidios (macro y microconidios), micelio y esclerocios. El ciclo sexual (ascosporas) raramente ocurre en la naturaleza, por consiguiente, el ciclo predominante es el asexual responsable de las epidemias policíclicas de *B. cinerea*. Los conidios y el micelio de *B. cinerea* se producen frecuentemente sobre los tejidos infectados de la planta. Los conidios, el órgano infectivo de *B. cinerea*, se producen sobre esclerocios germinados o en hifas de tejidos infectados o rastrojos y usualmente son dispersados por el aire. La infección se inicia con la germinación de los conidios bajo el estímulo de nutrientes exógenos (pétalos de flores senescentes, granos de polen o melaza de insectos). Los conidios poseen un considerable potencial de supervivencia desde minutos a un año, dependiendo del aislamiento y de la edad de los conidios, tanto como de las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa y la luz del sol) (Zhou et al., 2018). El micelio, mayormente considerado como la estructura vegetativa de colonización del sustrato y absorción de nutrientes posee también un potencial de supervivencia. Estudios realizados en Canadá, Israel y España mostraron que *B. cinerea* sobrevive las duras condiciones del verano e invierno mayormente como micelio en restos de plantas. Los esclerocios, compactas masas de micelio, son las estructuras que sobreviven condiciones ambientales adversas tales como desecación, bajas o altas temperaturas, radiación UV y ataques microbianos. “Hsiang y Chastagner (1992) reportaron que los esclerocios de *B. cinerea* producidos in vitro pueden sobrevivir en el suelo por al menos 18 meses y posiblemente sean la fuente primaria de infección cuando las condiciones se vuelven favorables. Sin embargo, la importancia de los esclerocios como fuente

primaria de infección es controversial, dado que no se observan frecuentemente en los tejidos de todas las plantas infectadas” (Zhou, Op. Cit.).

La enfermedad del moho gris es particularmente devastadora en el cultivo de frutilla (Biel et al., 2023), donde puede causar pérdidas en rendimiento entre 20 a 30% y llegar al 50% en condiciones favorables para la infección (Baptista, 2012).

Para el manejo de la enfermedad se utilizaron y utilizan fungicidas que han generado problemas de resistencia, motivo por cual se aplican concentraciones mayores. Una estrategia que está asociada al riesgo de aumentar la cantidad de fungicidas presentes en los frutos cosechados (Zang y Farahbaksh, 2007). Ante esta situación problemática se observa un interés creciente por el estudio y uso de sustancias antifúngicas de origen vegetal consideradas seguras (Chen et al., 2023). En tal sentido, pueden citarse la determinación in vitro de efectos antifúngicos sobre *B. cinerea* de saponinas del árbol *Sapindus mukorossi* (Huang et al., 2024); de aceites esenciales de *Origanum vulgare* y otras especies de orégano (Zhao et al., 2021) y de *Lavandula officinalis* y *L. hybrida* (Álvarez García et al., 2023).

Estas sustancias antifúngicas reciben la denominación general de bioinsumos, definidos como aquellos productos “constituidos por microorganismos (hongos, bacterias, protozoos, virus), macroorganismos (ácaros, artrópodos, nematodos), extractos de plantas y compuestos derivados de origen biológico o natural, destinados a aplicarse como insumos en la producción agropecuaria, agroalimentaria, agroindustrial, agroenergética e incluso en el saneamiento ambiental. Estos productos mejorar la productividad, son amigables con el medio ambiente y contribuyen al agregado de valor en origen” (Starobinsky et al., 2021).

En este contexto, el presente trabajo se propuso como objetivo evaluar in vitro el efecto de tres bioinsumos de origen botánico (*Origanum vulgare* L., *Lavandula officinalis* L. y *Equisetum giganteum* L.) sobre el crecimiento y desarrollo de *B. cinerea*.

2. Materiales y Métodos

Patógeno: se utilizaron esclerocios y conidios de *B. cinerea*, aislados de conocarpos de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) sintomáticos y presentando signos de moho gris.

Bioinsumos: se obtuvieron decocciones por separado de orégano (*O. vulgare*), lavanda (*L. officinalis*) y cola de caballo (*E. equisetum*). Para lo cual se colocaron 5 g del material vegetal, 24 h antes de realizar la decocción, en 500 ml de agua fría. Luego se llevó a ebullición durante 20 minutos y se dejó enfriar.

Técnica: se depositaron 2 ml de la decocción en el centro placas de Petri esterilizadas, a continuación se añadieron aproximadamente 8 ml de medio de cultivo agar papa glucosado al 2% y se homogeneizó el contenido. Una vez solidificado el medio se procedió a: i) sembrar dos esclerocios de *B. cinerea* en los extremos de la placa conteniendo la decocción y el medio de cultivo. Previa siembra los esclerocios se desinfectaron en una solución de hipoclorito al 2% durante 2 minutos, luego se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron con papel de cocina esterilizado. Este procedimiento se realizó para cada

decocción por separado utilizando tres repeticiones (una placa=una repetición); y ii) la siembra con ansa calibrada de 0,01 ml de una suspensión de conidios de *B. cinerea* obtenida a partir de un fruto (conocarpo) infectado. Previa obtención de la suspensión en agua destilada estéril, el fruto fue desinfectado por inmersión en una solución de hipoclorito al 2% durante un minuto y sometido a tres enjuagues sucesivos. La siembra se efectuó en el centro de placas con medio de cultivo + decocción. El procedimiento se repitió para cada decocción por separado, con tres repeticiones y como testigos se sembraron esclerocios y conidios en placas. Las placas se incubaron durante 14 días a temperatura ambiente y luz natural.

La observación de la germinación de esclerocios y el desarrollo de micelio y conidios se realizó cada 24 h, al igual que la medición del diámetro de colonias desarrolladas a partir de la siembra de esclerocios. Para la observación de las estructuras desarrolladas a partir de la siembra de suspensiones de *B. cinerea* se realizaron preparados en portaobjetos utilizando azul de metileno como solución de montaje, estos preparados fueron observados con un microscopio binocular (10 y 40X). Los datos cuantitativos se sometieron a un ANVA y a la prueba de Tuckey de comparación de medias utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

3. Resultados y Discusión

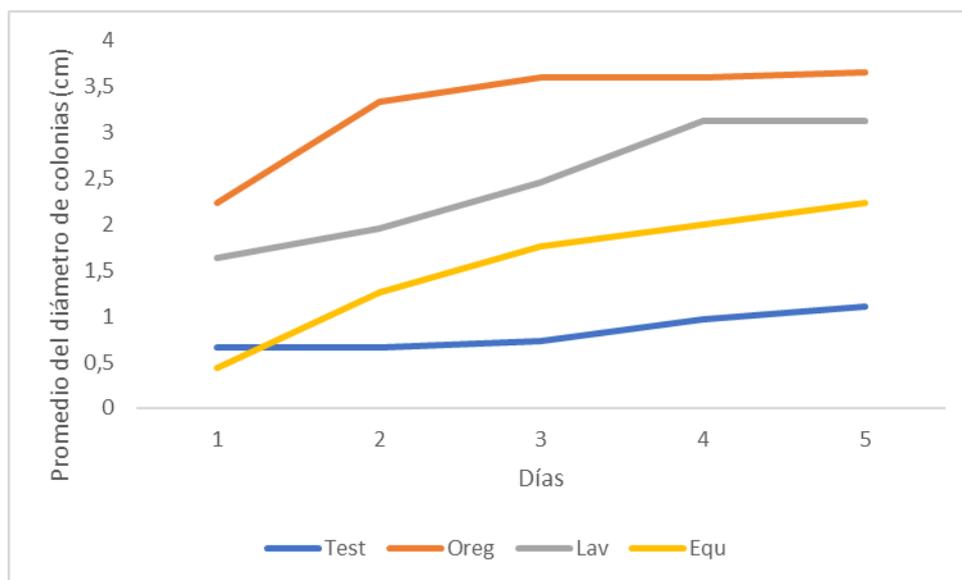
Siembra de esclerocios de *B. cinerea*

En las placas donde se sembraron esclerocios de *B. cinerea* pudo observarse en todos los casos, incluyendo las placas testigo que sólo contenían medio de cultivo y esclerocios, la germinación de estas estructuras de resistencia y la subsiguiente formación de colonias. La comparación de los promedios del diámetro de colonias registrados al quinto día de la prueba mostró que los mayores promedios correspondieron en orden descendente a orégano, lavanda, cola de caballo y el testigo (Figura 1) y las diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

La adición de las decocciones de orégano, lavanda y cola de caballo estimuló la germinación de los esclerocios y el desarrollo de las colonias del patógeno en comparación con el desarrollo de las colonias del testigo.

Figura 1

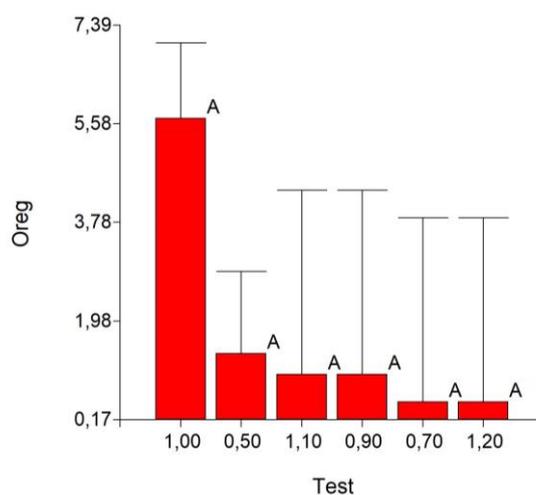
Promedio del diámetro de colonias crecidas a partir de la siembra de esclerocios en medio de cultivo adicionado con tres bioinsumos de origen botánico.



Cuando se procedió al análisis del diámetro de colonias crecidas en el medio de cultivo + bioinsumo en relación al tiempo (medido en días) en comparación con lo ocurrido con las colonias del testigo, se observó que el diámetro de las colonias de *B. cinerea* crecidas en el medio adicionado con el bioinsumo a base de orégano mostró mayores valores durante los cinco días en comparación con el testigo (Figura 2).

Figura 2

Diámetro de colonias de B. cinerea crecidas en el medio de cultivo + bioinsumo a base de orégano. *

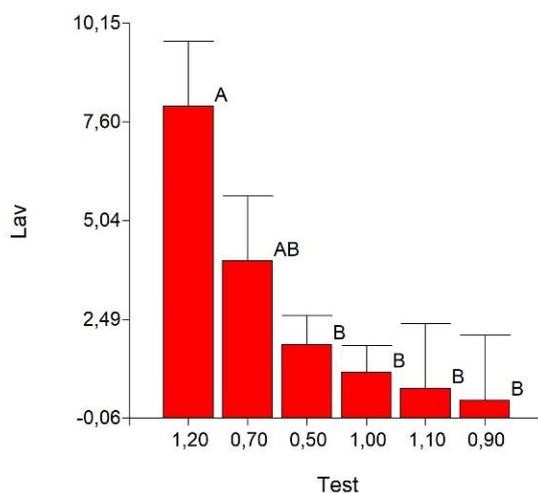


* Letras diferentes señalan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). Las líneas por encima de las barras indican el desvío estándar.

Mientras que, la evolución a lo largo de la prueba del diámetro de las colonias de *B. cinerea* crecidas en el medio adicionado con el bioinsumo a base de lavanda mostró valores mayores y estadísticamente significativos en comparación con el testigo a partir del tercer día de la prueba (Figura 3).

Figura 3

Diámetro de colonias de *B. cinerea* crecidas en el medio de cultivo + bioinsumo a base de lavanda. *

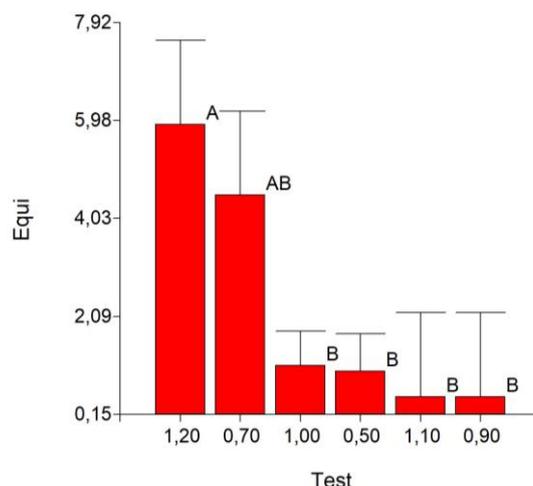


* Letras diferentes señalan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). Las líneas por encima de las barras indican el desvío estándar.

Finalmente, los resultados alcanzados con el bioinsumo a base de cola de caballo fueron muy similares (Figura 4) a los indicados para lavanda.

Figura 4

Diámetro de colonias de *B. cinerea* crecidas en el medio de cultivo + bioinsumo a base de cola de caballo. *



* Letras diferentes señalan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). Las líneas por encima de las barras indican el desvío estándar.

Los resultados mostrados en el presente trabajo difieren de los obtenidos por Santoro et al. (2018) y Álvarez García et al. (2023), autores que destacaron el alto efecto antifúngico de *O. vulgare* y otras especies de orégano sobre *B. cinerea* en estudios *in vitro* utilizando aceites esenciales en fase vapor. Los mismos autores señalaron que la aplicación de bioinsumos a base de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), una especie perteneciente a la familia Lamiaceae al igual que el orégano, tuvo un resultado negativo al aumentar la incidencia del moho gris causado por *B. cinerea* en damasco y durazno.

Por otra parte, la estimulación del desarrollo de colonias de *B. cinerea* mediada por bioinsumos a base de lavanda y cola de caballo es coincidente con los resultados mostrados por Yan et al. (2021). Los autores informaron, a partir de estudios *in vitro*, que extractos y aceites de lavanda fueron los menos efectivos contra *B. cinerea*. Mientras que, Pazmiño Miranda (2018) y Sandoval et al. (2023) mostraron que, de manera contraria a lo esperado, decocciones y extractos de cola de caballo estimularon el crecimiento de *B. cinerea* en estudios realizados *in vitro* con el propósito de evaluar el potencial fungicida de esta planta. El efecto estimulante de los bioinsumos sobre el diámetro de las colonias, desarrolladas a partir de la siembra de esclerocios, podría deberse a la presencia de factores exógenos de carácter nutrimental en las decocciones. Factores exógenos que, de manera semejante a lo observado por Zhou et al. (2018) en la germinación de conidios de *B. cinerea*, habrían estimulado la germinación de los esclerocios y el desarrollo de colonias del patógeno. Dicho efecto estuvo limitado a la germinación de los esclerocios y al posterior desarrollo de colonias conformadas sólo por micelio. Esto es, no se observó la producción de conidios de *B. cinerea* ni de esclerocios en ninguna de las colonias crecidas a partir de esclerocios en las placas adicionadas con los bioinsumos al contrario de lo observado en el testigo.

Si bien la no formación de conidios podría considerarse como un aspecto positivo, dada su importancia en la epidemiología de *B. cinerea*, este efecto se anula por el

desarrollo de micelio observado. Esto en virtud del potencial de supervivencia del micelio de *B. cinerea* en restos de plantas infectadas, potencial que lo constituye como fuente primaria de infección (Zhou et al., 2018).

Siembra de suspensiones de conidios de *B. cinerea*

La observación de preparados de estructuras fúngicas obtenidos de las colonias desarrolladas a partir de la siembra de suspensiones de conidios de *B. cinerea*, permitió advertir diferencias morfológicas en las estructuras fúngicas del hongo crecidas sobre el medio de cultivo adicionado con los bioinsumos de origen botánico en comparación con el testigo. En tal sentido, sobre las placas adicionadas con orégano, lavanda y cola de caballo sólo desarrollaron hifas adelgazadas, e hifas con pared engrosada, acompañadas de hifas con células compactas isodiamétricas (Figura 5).

Figura 5

Morfología de las hifas desarrolladas en medio de cultivo adicionado con bioinsumos



pe: paredes engrosadas, ci: células isodiamétricas, ha: hifas adelgazadas (40X)

Tanto el adelgazamiento como el engrosamiento de la pared de las hifas de *B. cinerea* fue reportado por Huang et al. (2024) como respuesta a la aplicación de extractos de saponinas de *Sapindus mukorossi*. Sin embargo, Latorre et al., (2015) señalan que el engrosamiento de la pared es una característica común de *Botrytis*. Por otra parte, Arseniuk & Macewicz (1993) observaron la presencia de células isodiamétricas en la corteza de esclerocios maduros e inmaduros de *Sclerotinia trifolirum* y *S. minor*. Excepto las células isodiamétricas no se observaron en el presente trabajo otras estructuras consistentes con el desarrollo de esclerocios,

Durante las observaciones realizadas, en preparaciones obtenidas de placas adicionadas con los tres bioinsumos, no se detectó la presencia de conidios, al contrario de lo detectado en las preparaciones procedentes de las placas testigo (medio de cultivo + suspensión de conidios de *B. cinerea*) donde pudo apreciarse

la presencia de conidióforos, conidios y esclerocios jóvenes del patógeno (Figura 6).

Figura 6

Estructuras reproductivas y de resistencia de B. cinerea desarrolladas en las placas testigo



co: conidios, ej: esclerocio joven, cd: conidioforo

Por consiguiente, los bioinsumos (orégano, lavanda y cola de caballo) inhibieron el desarrollo de conidios. Cheung et al. (2020). Sostienen que, los conidios constituyen el principal medio de transmisión de la enfermedad al ser diseminados por el aire

4. Conclusiones

En virtud de los resultados alcanzados pueden formularse las siguientes conclusiones:

Los bioinsumos a base de *O. vulgare*, *L. officinalis* y *Equisetum giganteum* estimularon sólo el crecimiento micelial de colonias de *B. cinerea* desarrolladas a partir de la siembra de esclerocios. Esto es, afectaron la formación de conidios y de esclerocios del patógeno.

Con la utilización del bioinsumo a base de *O. vulgare* se observó el mayor diámetro de colonias de *B. cinerea* en el menor lapso de tiempo.

Los bioinsumos a base de *O. vulgare*, *L. officinalis* y *Equisetum giganteum* afectaron la formación de conidios y esclerocios de *B. cinerea* en la prueba iniciada a partir de la siembra de conidios del patógeno.

Por consiguiente, los bioinsumos probados inhibieron la formación de conidios y esclerocios de *B. cinerea*: Esto es, de uno de los dos inóculos principales y de la forma de resistencia de la enfermedad, respectivamente

5. Referencias bibliográficas

- Álvarez García, S., Moumni, M. & Romanazzi, G. (2023). Antifungal activity of volatile organic compounds from essential oils against the postharvest pathogen *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicoa*, *Monilinia fructigena* and *Monilinia laxa*. *Front. Plant. Sci.* 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1274770/full>
- Arseniuk, E. & Macewicz, J. (1993). Scanning electron microscopy of Sclerotia of *Sclerotinia trifoliorum* and related species. *J. Phytopathology* 141, 275-284.
- Baptista, F. J., Bailey, B. J. & Meneses, J. F. (2012). Effect of nocturnal ventilation on the occurrence of *Botrytis cinerea* in Mediterranean unheated tomato greenhouse. *Crop Protection* 32, 114-149.
- Chen, D., Chen, T., Chen, Y., Zhan, Z., Li, B. & Tian, S. (2023). Bio-source substances against postharvest diseases of fruits: Mechanism, applications and perspectives. *Postharvest Biology and Technology* 198. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925521423000017>
- Cheung, N., Tian, L., Liu, X. & Li, X. (2020). The destructive pathogen *Botrytis cinerea*-Insights from genes studied whit mutant analysis. *Pathogen* 9(11), 923. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7695001/>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Tablada, M. y Robledo, C. W. (2020). InfoStat versión 2020. <https://www.infostat.com.ar/>
- Huang, X., Liu, W., Dong, F., Xu, Y. & Tian, S. (2024). *Sapindus mukorossi* saponin inhibit gray mold on strawberry fruit by impairing membrane integrity and organellar homeostasis of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 207. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521423003551>
- Latorre, B. A., Elfar, K. & Ferrada, E. E. (2015). Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 42(3), 305-330.
- Pazmiño Miranda, N. P. (2018). Métodos alternativos de fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* en fresa (*Fragaria vesca*). *Innova Research Journal* 3(2.1.), 52-58.
- Sandoval, M. C., Gilardino, M. S., Barrios, M. B., Fernández, M. V., Piwowarczuck, C. y Mollá Kralj, A. (2023). Evaluación del efecto de *Equisetum giganteum* L. y *Trichoderma* sobre el crecimiento y desarrollo de *Botrytis cinerea*

- Whetzel y *Colletotrichum falcatum* Wend. *Revista Científica y Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental* 10(1), 20-30.
- Santoro, K., Maghzenani, M., Chiabrando, V., Bosio, P., Gullino, M. L., Spadaro, D. & Giacalone, G. (2018). Thyme and savory essential oil vapor treatments control brown rot and improve the storage quality of peaches and nectarines, but could favor gray mould. *Foods* 7, 1-17. <https://www.mdpi.com/2304-8158/7/1/7>
- Shemshaki, N. S., Sharifi, K., Khodaparast, S. A., Mamani, L. & Mousanejad, S. (2023). The effect of several mineral formulations on controlling strawberry blossom blight due to *Botrytis cinerea*. *Research Square*. Preprints. <https://www.researchgate.net/publication/374775523> [The effect of several mineral formulations on controlling strawberry blossom blight due to Botrytis cinerea](https://www.researchgate.net/publication/374775523)
- Starobinsky, G., Monzón, J., Di Marzo Broggi, E. y Braude, E. (2021). *Bioinsumos para la agricultura que demandan esfuerzos de investigación y desarrollo. Capacidades existentes y estrategia de política pública para impulsar su desarrollo en Argentina*. Ministerio de Desarrollo Productivo Argentina.
- Yan, J., Wang, H., Chen, K., Feng, J. & Zhang, Y. (2021). Antifungal activities and mode of action of *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris* and *Origanum heracleoticum* oils vapor against *Botrytis cinerea* and their potential application to control postharvest strawberry gray mold. *Foods* 10(10). <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/10/2451>
- Yang, P., Zhao, Z., Virag, A., Becker, T., Zhao, L., Liu, W. & Xia, Y. (2023). *Botrytis cinerea* inoculation Assay for Early-, Middle- and Late-stage Strawberry. *Bio-protocol* 13, 20. <https://en.bio-protocol.org/en/bpdetail?id=4859&type=0>
- Zhao, Y., Yang, Y., Ye, M., Wang, K. B., Fan, L. M. & Su, F. W. (2021). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Origanum vulgare* against *Botrytis cinerea*. *Food Chemistry* 365. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814621015120?via%3Dihub>
- Zhou, Y., Li, N., Yang, J., Yang, L. & Wu, M. (2018). Contrast between orange and – black-colored sclerotia of *Botrytis cinerea*: Melanogenesis and ecological fitness. *Plant Disease* 102, 428-436.