

Efectos de extractos de ricino (*Ricinus communis* L.) y de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el crecimiento y desarrollo de *Botrytis cinerea* Whetzel y *Penicillium* Link, patógenos del cultivo de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Trabajo final de grado presentado para optar al título de Ingeniero Agrónomo

Autor: Cristian Iván Belesansky

Director: Lic. Nicolás Manuel Gutierrez

Co-Directora: Ing. Agr. MSc. María Cristina Sandoval



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOMAS DE ZAMORA**



Lomas de Zamora, septiembre de 2021

Universidad Nacional de Lomas de Zamora

Facultad de Ciencias Agrarias

**Efectos de extractos de ricino (*Ricinus communis* L.) y de
Trichoderma harzianum Rifai sobre el crecimiento y
desarrollo de *Botrytis cinerea* Whetzel y *Penicillium* Link,
patógenos del cultivo de frutilla (*Fragaria x ananassa*
Duch.)**

Trabajo final de grado presentado para optar al título de Ingeniero Agrónomo

Cristian Iván Belesansky

Director: Lic. Nicolás Manuel Gutierrez

Co-Directora: Ing. Agr. MSc. María Cristina Sandoval

Lomas de Zamora, Septiembre de 2021

RESUMEN

La utilización indiscriminada de productos químicos para el manejo de plagas y enfermedades en la producción agrícola ha generado problemas en la salud de los consumidores, productores y causado también desequilibrios ambientales. El desarrollo y la utilización de insumos biológicos para el manejo de problemas fitosanitarios revisten sumo interés a la hora de pensar en una producción de alimentos sostenible en el tiempo. Tal es el caso del cultivo de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duchesne) donde se utilizan productos químicos para el control de plagas y principalmente enfermedades. En este contexto, es necesaria la investigación científica para el descubrimiento, puesta en valor, y desarrollo de nuevas alternativas al control químico. El objetivo del estudio consistió en evaluar el efecto de la utilización de cepas de *Trichoderma harzianum*, extractos hidrosolubles de semillas de ricino (*Ricinus communis* L.) y aceite de ricino en el crecimiento y desarrollo de *Botrytis cinerea* y *Penicillium*, hongos patógenos del cultivo de frutilla. Para lo cual, se obtuvieron tres extractos hidrosolubles de semillas de ricino. Con los extractos obtenidos y un aislamiento de *Trichoderma* se realizaron pruebas *in vitro* tendientes a determinar el efecto del aceite de ricino sobre el crecimiento de colonias de *Botrytis*, y del extracto de ricino y *Trichoderma* sobre *Penicillium*. Los resultados alcanzados mostraron que, de manera contraria a lo esperado, el aceite de ricino estimuló el crecimiento de *Botrytis* en relación directa con el aumento de la concentración. Por otra parte, los extractos de ricino y *Trichoderma* mostraron su efectividad en la reducción de colonias de *Penicillium* en un 87 y 55 %, respectivamente.

Palabras clave: *Ricinus communis*, *Trichoderma*, bioinsumo, biocontrol, salud ambiental.

ABSTRACT

The indiscriminate use of chemical products for the management of pests and diseases in agricultural production has generated health problems for consumers and producers and has also caused environmental imbalances. The development and use of biological inputs for the management of phytosanitary problems are of great interest when thinking about sustainable food production over time. Such is the case of strawberry cultivation (*Fragaria x ananassa* Duchesne) where chemical products are used to control pests and mainly diseases. In this context, scientific research is necessary for the discovery, enhancement, and development of new alternatives to chemical control. The objective of the study was to evaluate the effect of using *Trichoderma harzianum* strains, water-soluble castor bean extracts (*Ricinus communis* L.) and castor oil on the growth and development of *Botrytis cinerea* and *Penicillium*, pathogenic fungi of strawberry cultivation. For which three water-soluble extracts of castor seeds were obtained. With the extracts obtained and an isolation of *Trichoderma*, in vitro tests were carried out to determine the effect of castor oil on the growth of *Botrytis* colonies, and of castor extract and *Trichoderma* on *Penicillium*. The results achieved showed that, contrary to expectations, castor oil stimulated the growth of *Botrytis* in direct relation to the increase in concentration. On the other hand, castor extracts and *Trichoderma* showed their effectiveness in reducing *Penicillium* colonies 87 and 55 %, respectively.

Key words: *Ricinus communis*, *Trichoderma*, bioinsume, biocontrol, environmental health.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
1. Introducción	10
2. El cultivo de frutilla	15
2.1 Mercado nacional	15
2.2. Mercado internacional	17
2.3. Consumo en Argentina y en el mundo	19
2.4. Principales enfermedades fúngicas que afectan el cultivo de frutilla	19
2.4.1. Enfermedades fúngicas presentes a campo	19
2.4.1.1. Tizón (<i>Dendrophoma obscurans</i>).....	19
2.4.1.2. Mancha zonal (<i>Zythia fragariae</i>)	20
2.4.1.3. Viruela (<i>Ramularia brunnea</i>).....	20
2.4.1.4. Antracnosis (<i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>C. fragariae</i> , <i>C. gloesporoides</i>)	20
2.4.1.5. Marchitamiento y podredumbre de corona y raíces (<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Pestalotiopsis</i> , <i>Phytophthora</i>).....	21
2.4.2. Enfermedades fúngicas de postcosecha	22
2.4.2.1. Pudrición (<i>Rhizopus stolonifer</i>):	23
3. Moho gris (<i>Botrytis cinerea</i> Pers.)	24
3.1. Características del patógeno.....	24
3.2. Resistencia a fungicidas.....	27
3.3. Patogenicidad	27
3.4. Síntomas causados por <i>B. cinerea</i> en frutilla	27
3.5. Condiciones favorables para su desarrollo	29
3.6. Epidemiología	29
3.8. Manejo de la enfermedad.....	35
4. <i>Penicillium</i>	36

4.1. Características del patógeno.....	37
4.2. Condiciones favorables para su desarrollo	38
4.3. Micotoxinas	39
5. <i>Trichoderma harzianum</i>	39
5.1. Características del hongo.....	40
5.2 Antecedentes de <i>Trichoderma</i> en control biológico	42
6. Ricino (<i>Ricinus communis</i> L.).....	43
6.1. Características de la planta.....	45
6.2. Componentes tóxicos.....	49
6.2.1. Ricina	50
6.2.2. Aglutinina <i>Ricinus communis</i> (RCA)	53
6.2.3 Ricinina	55
6.2.4 Otros compuestos	56
6.3. Aceite	57
7. Normativa sobre la utilización de agroquímicos	58
7.2. Uso del bromuro de metilo	62
7.3. Convenio de Viena	63
7.4. Protocolo de Montreal	63
8. Problema de investigación	64
9. Objetivo	65
9.1 Objetivo general	65
9.2 Objetivos específicos	66
10. Hipótesis.....	66
11. Materiales y Métodos	66
11.1. Aceite de ricino.....	66
11.2. Extractos de ricino.....	67
11.2.1. Obtención de los extractos.....	68
Ricino I.....	69
Ricino II.....	71
Ricino III.....	71
11.3. Obtención de la cepa de <i>Trichoderma</i>	72

11.4. Obtención de cepas de hongos patógenos	73
11.5. Pruebas de inhibición <i>in vitro</i>	74
11.5.1. Aceite de ricino.....	74
11.5.2. Extractos de ricino.....	74
11.5.3. Prueba de antagonismo con <i>Trichoderma</i>	74
12. Resultados y Discusión	75
12.1. Aceite de ricino.....	75
12.2. Extractos de ricino.....	77
12.3. Pruebas de antagonismo con <i>Trichoderma</i>	80
13. Conclusiones	84
14. Bibliografía	87
15. Anexos	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Temperatura y actividad del agua necesarias para el crecimiento de algunas especies de <i>Penicillium</i> (Corey 1997, Lacey 1989).....	39
Tabla 2. Clasificación toxicológica según riesgos y valores de DL50 aguda de productos formulados.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conidióforos y conidios de <i>B. cinerea</i>	25
Figura 2. Moho gris en diferentes partes de la planta: a) esporulaciones en un peciolo muerto; b) infección de fruto desde tejidos enfermos; c) infección de fruto a través de la flor.....	28
Figura 3. Moho gris sobre frutilla, síntoma característico causado por <i>B. cinerea</i>	28
Figura 4. Esclerocios de <i>B. cinerea</i> sobre un peciolo de frutilla.....	30
Figura 5. Micrografía electrónica de barrido de conidióforos de <i>B. cinerea</i> con conidios maduros <i>in situ</i>	31
Figura 6. Conidios multinucleados de <i>B. cinerea</i>	31
Figura 7. Micrografía electrónica de barrido de la germinación de un conidio en ausencia de agua sobre la cara abaxial de un pétalo de rosa.....	33
Figura 8. Infección quiescente en una flor de frambuesa: hifas de <i>B. cinerea</i> creciendo dentro del tejido de transmisión en ausencia de tubo polínico (tinción con azul de anilina y vista por microscopía de fluorescencia).....	34
Figura 9. Estructuras de <i>Penicillium</i> sp (40X), conidióforos: cd; fiálides: fi; conidios: ci.....	37
Figura 10. Estructuras de <i>Trichoderma</i> sp (40X), conidióforos: cd; fiálides: fi; conidios: ci; clamidosporas: cl.....	41
Figura 11. Colonias de distintos aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp. Sobre medio de cultivo APG.....	41
Figura 12. Aspecto de la planta entera de <i>R. communis</i>	46
Figura 13. Variaciones en el aspecto de las hojas de <i>R. communis</i>	47
Figura 14. Aspecto de las inflorescencias de <i>R. communis</i>	47
Figura 15. Detalle de las flores femeninas y masculinas de <i>R. communis</i>	48
Figura 16. Frutos en diferentes estados de madurez de <i>R. communis</i>	48
Figura 17. Aspecto de las semillas de <i>R. communis</i>	49
Figura 18. Descripción esquemática de los principales componentes de la planta <i>R. communis</i>	50
Figura 19. Características de las Proteínas Inactivadoras de Ribosomas (RIB). 52	
Figura 20. Mecanismo de acción de la ricina.	53
Figura 21. Estructura de la ricina.....	55
Figura 22. Fitoquímicos de <i>R. communis</i> y su actividad farmacológica.	57
Figura 23. Tipos de agroquímicos	58
Figura 24. Prensa para la extracción del aceite de las semillas de ricino.....	68
Figura 25. Material resultante tras prensar las semillas.	68
Figura 26. Solución en el agitador mecánico.....	70

Figura 27. Detalle de los filtros Whatman N° 41.	70
Figura 28. Soluciones obtenidas a partir de la muestra inicial según tres procedimientos.	72
Figura 29. Fruto con síntomas de podredumbre y desarrollo micelial.	73
Figura 30. Desarrollo de esclerocios en concentraciones de 250 ppm (A) y 300 (B) ppm luego de la incubación.	76
Figura 31. Evolución de la formación de esclerocios en placas adicionadas con la concentración de 350 ppm.	76
Figura 32. Crecimiento de colonias de <i>Penicillium</i> sp. bajo tres tratamientos (Ricino I, II y III) y un testigo (<i>Penicillium</i> individual).....	79
Figura 33. Diámetro de colonias de <i>Penicillium</i> sp. bajo tres tratamientos (Ricino I, II y III) y un testigo (<i>Penicillium</i> individual). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con un n muestral igual a 12. Las líneas por encima de las barras indican el error de la media.	79
Figura 34. Porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. en medio APG bajo tres tratamientos.	80
Figura 35. Diámetro de colonias de <i>Penicillium</i> y <i>Trichoderma</i> en cultivo individual y dual. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con un n muestral igual a 12. Las líneas por encima de las barras indican el error de la media.	82
Figura 36. Diámetro de colonias de <i>Penicillium</i> sp. en cultivo dual con <i>Trichoderma</i> e individual (testigo).	83
Figura 37. Diámetro de colonias de <i>Trichoderma</i> en cultivo dual con <i>Penicillium</i> sp. e individual (Testigo).	83
Figura 38. Análisis estadístico según programa Infostat para prueba con extractos de ricino. Referencias: A (Ricino I), B (Ricino III), C (Ricino II), <i>Penicillium</i> (Testigo).	105
Figura 39. Análisis estadístico según programa Infostat para prueba con <i>Trichoderma</i>	105

1. Introducción

El cultivo de frutilla es afectado por distintas enfermedades que inciden negativamente en la longevidad de la planta, el rendimiento y la calidad de la fruta. Dentro de estas patologías se pueden reconocer: aquellas que son frecuentes y causan daños importantes en las plantaciones; las ocasionales y que bajo condiciones excepcionales causan daños a las plantas; y las enfermedades de postcosecha (Undurruga y Vargas, 2013). Las pérdidas económicas que causan las enfermedades de postcosecha constituyen uno de los principales problemas de la actividad frutihortícola mundial (Murray *et al.*, 2019). Estas enfermedades son causadas por hongos de los géneros *Penicillium*, *Botrytis*, *Alternaria* y *Monilinia*, entre otros, que pueden invadir los frutos (Murillo *et al.*, 2016). La frutilla es susceptible a esta invasión debido a que posee una epidermis turgente y una elevada tasa de respiración (Fraire Cordero *et al.*, 2003).

Con relación al manejo de hongos en postcosecha, el uso de fungicidas químicos de síntesis se encuentra bajo observación debido a los efectos cancerígenos, teratogénicos, a la contaminación ambiental derivada de su uso y a otros efectos negativos para la salud de los consumidores (Tripathi y Shukla, 2007). La búsqueda de alternativas de bajo impacto ambiental para esta problemática incluye numerosas investigaciones con distintos microorganismos antagónicos, utilización de bioproductos y combinación con otros tratamientos. En tal sentido, en frutilla pueden mencionarse los resultados mostrados para el control de *Botrytis* durante el desarrollo del cultivo y del fruto postcosecha con *Gliocladium roseum* (Chaves y Wang, 2004) y

con *Trichoderma* (Murray *et al.*, 2019); y para *Penicillium expansum* con *Trichoderma* (Droby *et al.*, 2003).

Entre los bioproductos, el uso de aceites esenciales para el controlar enfermedades en postcosecha está recibiendo una creciente atención debido a sus características de seguridad y biodegradabilidad. Se reconoce que algunos aceites esenciales tienen propiedades antivirales, antifúngicas, antiparasitarias e insecticidas (Sivakumar y Bautista Baños, 2014). El aceite de ricino o castor (*Ricinus communis* L.), es un aceite comercial de uso industrial que se obtiene a partir de las semillas de dicha planta, las cuales contienen entre 35/46-53 % de aceite (Correa Salgado, 2014; Pita *et al.* 2004, Rodríguez Arias, 2010). “Las semillas de ricino contienen además hasta un 25% de proteína, así como carbohidratos (p. ej., fructosa, glucosa, sacarosa), escualeno, ácido succínico, compuestos amargos, lecitina y otros (Hänsel *et al.*, 1994; Frohne y Pfänder 2004)” (Franke *et al.*, 2019). El aceite de ricino tiene actualmente una alta demanda en el mercado, debido a que posee muy buenas características químicas que hacen que pueda ser utilizado en la elaboración de diferentes productos en las industrias farmacéuticas, de pintura, entre otras. El aceite de ricino posee características muy diferentes a las de los aceites considerados *commodities* como los de soja y girasol y se destina exclusivamente a aplicaciones industriales, ya que no es apto para uso alimenticio humano o animal. Una de sus características particulares es que está conformado por casi un 90 % de un único ácido graso llamado ricinoleico, por lo tanto, desde un punto de vista de su composición acídica, es el aceite que naturalmente presenta mayor grado de pureza química. Esta propiedad resulta particularmente valiosa para la industria química y farmacológica que basa sus

procesos en la transformación del ácido ricinoleico en otros compuestos de mayor valor (De La Fuente *et al.*, 2013). El aceite se utiliza en la fabricación de pinturas, jabones, barnices, productos de cosmética y lubricantes, entre otros (Pita *et al.* 2004). También se ha utilizado como purgante y se describe como un laxante eficaz (Franke *et al.*, 2019). Además, tiene alta demanda en el mercado actual ya que es considerado como una alternativa para las energías renovables como la producción del biodiesel (Castañeda Lopez y Contreras Montejo, s.f.). El mayor productor de ricino es India, seguido por China y Brasil. La extracción de una tonelada de aceite genera 1,2 toneladas de residuos, denominados “torta”. Tanto la torta como las cáscaras pueden ser usadas como fertilizantes orgánicos y como una alternativa alimenticia para rumiantes, por su alto valor proteico. Sin embargo, existen casos de envenenamiento en animales por la ingestión de la torta, por lo que es necesario un tratamiento químico o térmico (Gomes Raffagnato *et al.*, 2019). Esto es debido a que la torta posee en su composición ricina, ricinina y otras proteínas como las globulinas, las prolaminas y las gluteninas. La ricina es una proteína de 64 kD soluble en agua y de alta toxicidad para humanos, animales e insectos. Consta de dos cadenas polipeptídicas: una con propiedades de lectina, que le permite fijarse a glicolípidos y glicoproteínas presentes en la superficie de la membrana celular, y otra capaz de inhibir la síntesis de proteínas a nivel de los ribosomas (Pita *et al.*, 2004). El contenido de ricina por semilla es variable, pero se estima que se encuentra entre un 1-5 %. (Audi *et al.*, 2005; Schieltz *et al.*, 2010; Gomes Raffagnato *et al.*, 2019). La ricinina es un alcaloide, con fórmula $C_8H_8N_2O_2$, que tiene efectos sobre el sistema nervioso central (Correa Salgado, 2014).

Distintos estudios mostraron los efectos positivos del uso de extractos de ricino como insecticida sobre diferentes especies animales como la hormiga negra común (*Acromyrmex lundii*) (Caffarini *et al.*, 2008), diversas especies de larvas de mosquito, como *Anopheles gambiae*, *A. stephens*, *A. albopictus*, y *Culex quinquefasciatus* (Abdul *et al.*, 2018), la polilla de las harinas (*Plodia interpunctella*) (Colavino *et al.*, 2006) y el picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*) (Pacheco Sánchez *et al.*, 2009), entre otros y también como nematicida sobre el nemátodo barrenador (*Radhopolus similis*) (Arboleda *et al.*, 2012). También puede mencionarse que se descubrió que extractos metanólicos de hojas de ricino son activos inhibidores de crecimiento de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *S. abony*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Vandita *et al.*, 2013). En cuanto a su utilización para el manejo de hongos fitopatógenos, pueden mencionarse la utilización del extracto de ricino para retrasar el desarrollo del tizón tardío (*Phytophthora infestans*); la incorporación de la planta entera al suelo para el control de *Rhizoctonia solani* en almácigos y de *Colletotrichum coccodes* en cultivo de papa; la utilización de un biopreparado a base de plantas de ricino, madero negro (*Gliricidia sepium*) y papaya (*Carica papaya*) para el combate de la roya *Hemileia vastratix* en café (Ramos Jaramillo, 2014); la actividad inhibidora prominente de extractos metanólicos contra *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* (Abdul *et al.*, 2018) y contra *Candida albicans*, *Alternaria niger* y *Lasiodiplodia* (Vandita *et al.*, 2013).

Con estos antecedentes, se desarrolló el presente trabajo de carácter preliminar, tendiente a evaluar el nivel de actividad del aceite y de un extracto acuoso de ricino sobre el crecimiento y desarrollo de hongos patógenos que afectan el cultivo de frutilla

(principalmente en postcosecha) y comparar dicho nivel con el efecto de un aislamiento de *Trichoderma*.

2. El cultivo de frutilla

La frutilla es una planta que pertenece a la familia de las Rosáceas, subfamilia Rosoideas, género *Fragaria*. El origen de las actuales variedades comerciales de frutilla (predominantemente *Fragaria x ananassa* Duchesne) está dado por el cruzamiento de frutilla silvestre (*Fragaria chiloensis*) y fundamentalmente frutillas silvestres europeas, obteniendo así híbridos con mayores rendimientos, mejor tamaño de fruta, mayor sabor y aroma, y una mejor calidad y conservación postcosecha. La producción de frutillas es relevante tanto por el beneficio económico que reportan sus exportaciones como por la cantidad de mano de obra directa que requiere para la realización de los trabajos culturales y la cosecha. Su consumo en fresco, a diferencia de otras frutas finas, es relativamente común en el mercado interno; además se la utiliza en distintos productos como mermeladas, yogurt, helados y golosinas mientras, que el producto congelado se destina mayormente a la exportación. La frutilla es un alimento rico en nutrientes y vitaminas (B1, B2, B3, B5, B6, B12, E, A y C) así como en antioxidantes (alfacaroteno y betacaroteno entre otros). Además, aporta a la dieta varios minerales, entre los cuales se mencionan calcio, hierro, magnesio, fósforo y potasio (MAGyP, 2019).

2.1 Mercado nacional

El cultivo de frutilla en Argentina se extiende en tiempo y espacio, concentrado en diversas zonas del país a lo largo del año (Cote Daza, 2011).

En total se estima que actualmente la superficie cultivada ronda las 1.500 hectáreas con un total de 45.000 a 50.000 toneladas anuales (MAGyP, 2019). En lo

que se refiere al Mercado Central de Buenos Aires, la oferta de frutillas ha ido incrementándose entre los años 2002 y 2009 pasando de 2.500 toneladas hasta 8.500 aproximadamente, bajando paulatinamente hasta las 5.000 toneladas en el año 2012 para mantenerse entre este valor y las 5.500 en los años hasta el 2018 (MAGyP, 2019).

Las provincias del NOA (Noroeste Argentino), Tucumán a la cabeza, Santa Fe, el cinturón verde de la Ciudad de Buenos Aires, las provincias del NEA (Noreste Argentino), principalmente Corrientes y, por último, la región de Cuyo, con el Valle de Uco en Mendoza, constituyen las principales zonas productoras del país. La localidad de Coronda (Santa Fe) es la principal productora de frutillas del país, seguida por Lules en Tucumán, siendo estas dos localidades por sus volúmenes producidos y por los momentos en que ingresan al mercado, las formadoras del precio de las frutillas en el mercado nacional (Caminiti, 2015).

Según Cote Daza (2011): Se establecen 3 zonas de producción: Norte (abarca las regiones de Tucumán, Coronda, y Corrientes con producción en invierno y primavera), centro (se localiza en La Plata, Gran Buenos Aires y Mar del Plata con producción primavero-estival) y sur (contempla a las provincias patagónicas).

A continuación, se detalla brevemente la distribución de la producción de frutilla en las diferentes provincias a lo largo del año:

- En la provincia de Santa Fe, de mediados de junio a fines de diciembre. En Tucumán, la producción en piedemonte comienza a fines de marzo y se extiende hasta

fines de noviembre, y en los valles de altura desde inicio de septiembre hasta fines de marzo.

- En la provincia de Buenos Aires hay una producción a campo en la primera semana de febrero, luego desde mediados de marzo a mediados de mayo y finalmente desde mediados de septiembre a fines de diciembre. En Mar del Plata, la cosecha se presenta desde mediados de noviembre hasta principios del mes de mayo.

- En Neuquén y Río Negro desde comienzos de diciembre hasta fines de Febrero (Cote Daza, 2011).

En Argentina, la frutilla es la fruta fina más difundida, la de mayor aceptación por parte del consumidor argentino. Se comercializa fundamentalmente como fruta fresca (60-70 %) y fruta para industria (30-40 %) en sus diversas formas de congelados y derivados para la industria alimenticia (INTA, 2015).

La plantación de las frutillas se realiza sobre camellones. El sistema de cultivo más difundido es el sistema de camellón doble (un camellón con dos hileras de plantas) con la implementación de un mulching de polietileno. En producciones familiares de poca superficie se puede utilizar mulching naturales realizados a partir de aserrín, viruta (preferentemente de pino, salicáceas o de arbóreas nativas), paja, o de acículas de pino (pinocha); obteniéndose los mismos resultados de manera más económica, empleando residuos naturales (INTA, 2015).

2.2. Mercado internacional

Los principales productores mundiales en volumen son: China (40,35 %), Estados Unidos (15,70 %), México (7,13 %), Egipto (4,41 %), Turquía (4,33 %),

España (3,90 %), Corea (2,28 %) y Polonia (1,93 %) – Subtotal 80,04 %; otros 71 países 19,96 %. Argentina figura en el 34º lugar con el 0,14 % del total mundial (FAOSTAT 2017) (MAGyP, 2019).

“Principales exportadores mundiales en valor: Polonia (17,80 %), México (15,26 %), China (11,93 %), Egipto (7,13 %), Marruecos (6,83 %), Holanda (5,97 %), EEUU (5,73 %), España (5,32 %). Subtotal 75,99 %. Otros 70 países 24,01 %. Argentina figura en el 17º lugar aportando el 0,57 % del valor exportado a nivel mundial. (COMTRADE 2017)” (MAGyP, 2019).

En el hemisferio sur, Brasil es el mayor productor, sin embargo, esa producción no alcanza a satisfacer las necesidades de su mercado interno, en tanto Chile, Australia, Perú y Argentina son los otros países productores y exportadores, con una mínima participación en el mercado global de las frutillas (INTA, 2015).

En el período 2010-2017, los volúmenes exportados de frutilla congelada por Argentina fueron variables y promediaron en el período analizado las 5.400 toneladas. Entre las principales provincias exportadoras se destaca Tucumán. Los Estados Unidos y Brasil fueron los principales destinos de la frutilla congelada argentina, y los volúmenes exportados representaron en promedio el 49 % y 36 %, respectivamente. Otros destinos fueron Canadá, Japón y Uruguay, y otros mercados de menores volúmenes. En el período analizado, la frutilla comercializada en el Mercado Central de Buenos Aires promedió las 5.500 toneladas (EEAOC, 2018,).

2.3. Consumo en Argentina y en el mundo

El consumo de frutillas, en Argentina, se concentra en su mayoría entre los meses de septiembre a octubre y depende en buena medida del precio relativo de la fruta disponible en cada estación, rondando 1 kg/año/habitante. A nivel mundial el mayor consumo se registra en los mayores países productores y exportadores de frutillas como Estados Unidos (3,6 kg/año/habitante) seguidos por los países europeos (1,6 kg/año/habitante) mientras que en países asiáticos, como Corea y China, el escaso consumo actual (2,6 gr/año/habitante) se espera se incremente fuertemente como consecuencia de los cambios de hábitos de consumo (tendencia hacia una dieta más saludable), a la mayor concentración de la población en los centros urbanos y a su mayor poder adquisitivo (MAGyP, 2019).

2.4. Principales enfermedades fúngicas que afectan el cultivo de frutilla

A continuación, se describirán brevemente las principales enfermedades fúngicas (causadas por hongos y pseudohongos) que afectan al cultivo de frutilla, clasificándolas según momento de aparición (a campo o postcosecha), sintomatología predominante y agente causal. En tanto la enfermedad moho gris se detallará en extenso en los ítems siguientes.

2.4.1. Enfermedades fúngicas presentes a campo

2.4.1.1. Tizón (*Dendrophoma obscurans*)

Manchas foliares en forma de V, de color castaño oscuro rodeadas por una zona de color castaño claro y borde púrpura y peciolo con manchas de color castaño púrpura; puede causar defoliación severa. El hongo puede infectar peciolo,

estolones, cálices y frutos (Gilardino *et al.*, 2018). Temperaturas entre 20 y 30 °C y lluvias frecuentes, con períodos de hoja mojada mayores a 12 horas son con condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Kirschbaum *et al.*, s.f.).

2.4.1.2. Mancha zonal (*Zythia fragariae*)

Manchas de color castaño claro a violáceo con aspecto similar a las manchas causadas por *D. obscurans*. El patógeno puede formar estructuras negras (peritecios) a menudo visibles en manchas de hojas y lesiones de pecíolos. El patógeno puede colonizar el pedúnculo, el cáliz y otras partes de la flor causando el amarronamiento de las mismas. También puede colonizar los tallos y frutos causando la podredumbre de estos (Gilardino *et al.*, 2018).

2.4.1.3. Viruela (*Ramularia brunnea*)

Las infecciones ocurren principalmente en las hojas jóvenes, las manchas aparecen en la cara superior, en un principio son pequeñas, redondeadas y de color púrpura. Luego aumentan de tamaño, continúan siendo redondeadas, pero solo los bordes quedan de color púrpura, mientras que el centro se torna castaño y finalmente blanquecino. Pueden aparecer lesiones en la cara inferior de las hojas, pero en son de color menos intenso. Los síntomas en frutos se manifiestan como pequeñas manchas negras. (Gilardino *et al.*, 2018).

2.4.1.4. Antracnosis (*Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloesporoides*)

Puede causar lesiones en botones florales, flores, frutos, pecíolos, estolones, hojas, coronas y raíces. Los frutos cuando son pequeños se tornan color castaño

oscuro y quedan momificados. En frutos más desarrollados se producen varias lesiones redondeadas, hundidas y de color castaño; y si el tiempo está seco pueden presentar un halo oscuro o ser castaño oscuro. En cualquier caso, cuando sobreviene tiempo húmedo, las lesiones se cubren rápidamente de una masa mucosa color salmón, constituida por los conidios del hongo. En el caso de las coronas, su tejido interno puede presentar bandas oscuras porque las hifas colonizan a los vasos, lo que induce marchitamiento. Otro síntoma de las coronas es una podredumbre firme de color castaño-rojizo a castaño oscuro, asociada a marchitamiento y muerte de plantas. En las raíces el patógeno puede causar una podredumbre negra luego del trasplante, desde allí puede progresar a la base de la corona. Las plantas enfermas quedan de menor tamaño o mueren (González, 2017). Los estolones pueden presentar canchales negros que anillan pudiendo cortar la circulación entre la planta madre e hijas (Kirschbaum *et al.*, s.f.)

La presencia de la enfermedad es favorecida por temperaturas cercanas a 32° C y humedades relativas altas (mayores a 95 %) (Kirschbaum *et al.*, s.f.), presencia de malezas y problemas de aireación en el cultivo. Es común encontrar frutas podridas por antracnosis en campo. Se debe tener en cuenta que el patógeno que la causa puede sobrevivir en el suelo por lo menos 9 meses sin plantas hospederas. (CCB, 2015).

2.4.1.5. Marchitamiento y podredumbre de corona y raíces (*Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis*, *Phytophthora*)

Necrosis marmórea de color marrón anaranjado de los tejidos vasculares de la corona (Gilardino *et al.*, 2018). Cortando la corona longitudinal o transversalmente, se

observa coloración marrón a rojo ladrillo y a veces pudrición de raíces (Kirschbaum *et al.*, s.f.). Los síntomas aéreos se manifiestan en primavera con amarillez, hojas secas, marchitez, pérdida de frutos y muerte de la planta (ONUUDI, 2015). *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* afecta solo a las raíces; el daño puede comprometer gran parte de las raíces, dificultando la absorción de agua y nutrientes. *Phytophthora cactorum* afecta el centro de la corona, generando lesiones en aumento hasta abarcar toda la corona y causar la muerte de la planta. Debido a la muerte de la corona, las hojas se marchitan y secan en forma pareja a diferencia de *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* donde las hojas se secan en la periferia (ONUUDI, 2015).

2.4.2. Enfermedades fúngicas de postcosecha

Las enfermedades son la principal causa de pérdidas postcosecha en la frutilla. No se aplican a la fruta fungicidas en postcosecha; por lo tanto, el inmediato enfriamiento, el almacenamiento a 0 °C (32 °F), la prevención de daños físicos y el embarque con dióxido de carbono son los mejores métodos para el control de estas enfermedades. Además, durante la cosecha se debe tener la precaución de eliminar las frutas dañadas o con infecciones ya que éstas se propagan de las frutas enfermas a las sanas formando verdaderos nidos de pudrición (Mangione, 2013).

Existe una amplia lista de enfermedades postcosecha causadas por *Botrytis cinerea*, esta abarca desde el moho gris en diferentes órganos vegetales, incluyendo flores, frutas, hojas, brotes, hasta pudriciones de órganos de almacenamiento subterráneos (como en, zanahoria y batata); aunque el hongo no es considerado un verdadero patógeno radicular o que causa enfermedades transmitidas por el suelo (las llamadas *soil-borne diseases*). Los vegetales (tales como el repollo, la lechuga y

el brócoli) y los cultivos de frutos pequeños (como las uvas, frutillas, frambuesas y arándanos) son aquellos que se ven afectados más severamente (Droby y Lichter, 2004).

El problema principal que afecta a la conservación de los frutos es la sensibilidad que estos presentan a enfermedades causadas por diferentes hongos. De forma resumida podemos decir que, algunos autores (Fraire *et al.*, 2003) han llegado a encontrar sobre los frutos de frutilla hongos pertenecientes a diez géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Mangione, 2013).

La pudrición por *Botrytis* o moho gris causada por *Botrytis cinerea* es la mayor causa de pérdidas postcosecha en frutillas (Becerra *et al.*, 2013). Además de esta, *Rhizopus stolonifer* suele ser uno de los patógenos más abundantes:

2.4.2.1. Pudrición (*Rhizopus stolonifer*):

Las esporas generalmente están presentes en el aire y se propagan fácilmente. Este hongo no crece a temperaturas inferiores a 5 °C, por lo tanto, el buen manejo de la temperatura es el método más simple de control (Becerra *et al.*, 2013). Esta enfermedad se manifiesta en los frutos como una descomposición y licuefacción interna, debido a las enzimas liberadas por los hongos. Exteriormente, se observa una mancha de color pardo blanda. Luego la piel se rompe y exuda la pulpa deshecha y los jugos celulares que ensucian e infectan a los frutos vecinos. Estos jugos y tejidos afectados emanan un característico olor ácido. Frecuentemente, puede observarse sobre los frutos, una masa micelar filamentosa (moho) de color blanco donde

sobresalen las estructuras reproductivas de los hongos (pequeñas cabezuelas oscuras, fácilmente visibles) (SINAVIMO, s.f.).

“Entre sus características particulares, se encuentran la formación de micelio aéreo carente de septos y la producción de esporangióforos que presentan en sus puntas esporangios esféricos donde se alojan las esporangiosporas (Velázquez del Valle, *et al.*, 2007)” (Ruiz, 2017).

3. Moho gris (*Botrytis cinerea* Pers.)

Las enfermedades causadas por *Botrytis* son probablemente las enfermedades de vegetales, plantas ornamentales, frutales e incluso de cultivos extensivos; más comunes y ampliamente distribuidas por todo el mundo (Agrios, 2005). El moho gris en cultivos de frutilla, uvas y diversos vegetales; es considerada una de las enfermedades más serias que ocasiona *Botrytis* (Agrios, 2005). Además, *Botrytis* es uno de los agentes causales de podredumbres postcosecha de frutas y vegetales, ya sea durante el almacenamiento, transporte o incluso en el mercado (Agrios, 2005).

3.1. Características del patógeno

El agente causal del moho gris es el hongo *Botrytis cinerea*, cuya ubicación taxonómica es: Eukaryota – Fungi – Dikarya – Ascomycota – Pezizomycotina – Leotiomycetes – Helotiales – Sclerotiniaceae - *Botrytis* (National Center for Biotechnology Information, 2019).

B. cinerea forma conidios bastante grandes, ovalados o esféricos; que se forman en el ápice de conidióforos erectos simples o ramificados (**Figura 1**). La célula conidiógena se infla y produce muchos conidios simultáneamente sobre su superficie.

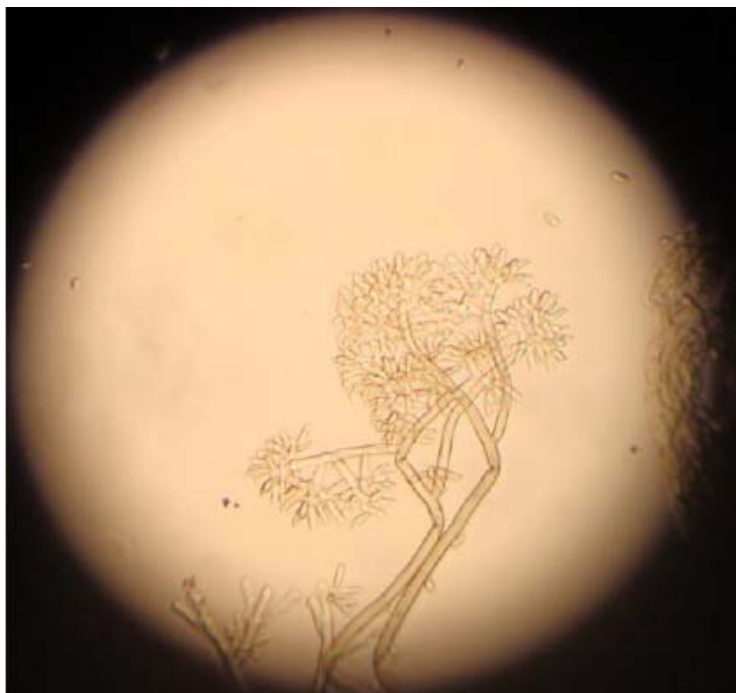


Figura 1. Conidióforos y conidios de *B. cinerea*.
Fuente: Cátedra de Fitopatología FCA-UNLZ

B. cinerea (teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana*) es un patógeno necrotrófico que se transporta por el aire y que ataca a más de 200 cultivos en todo el mundo. Es más destructivo en tejidos senescentes de plantas dicotiledóneas, pero por lo general infecta estos tejidos en una etapa mucho más temprana en el desarrollo de los cultivos y permanece en reposo durante un período considerable antes de la rápida pudrición de los tejidos cuando el medio ambiente es propicio y el hospedero experimenta cambios en su fisiología. Algunas monocotiledóneas también son susceptibles al ataque del patógeno, un grupo de especies de *Botrytis* infecta alrededor de una docena de ellas. (Williamson *et al.*, 2007)

B. cinerea Pers. es la más representativa del género *Botrytis*, el cual incluye cerca de 30 especies, que son principalmente necrófagos (Rupp *et al.*, 2017).

Estudios basados en secuencias de ADN revelaron que *Botrytis* se divide en dos clados filogenéticos. El clado 1 incluye a *B. cinerea* y *B. pseudocinerea* los cuales infectan mayoritariamente o exclusivamente a dicotiledóneas, así como también a especies hospedante-específico como *B. fabae*, *B. calthae*, *B. sinoviticola*, y *B. californica*. El clado 2 es filogenéticamente más diverso y consiste en miembros hospedante-específico que infectan predominantemente monocotiledóneas, pero también numerosas dicotiledóneas (Rupp *et al.*, 2017).

La secuenciación de ADN y el uso de marcadores genéticos basados en PCR han promovido satisfactoriamente estudios genéticos de aislamientos del moho gris y contribuido en la identificación de nuevas especies de *Botrytis* como las mencionadas anteriormente *B. sinoviticola*, *B. californica* y otras como *B. deweyae*, *B. prunorum* y *B. pyriformis* (Rupp *et al.*, 2017).

Debido a la gran variedad de modos de ataque y a diversos hospedantes como fuentes de inóculo, además de su alta capacidad de supervivencia como esclerocios en los restos de cosecha; es poco probable que el uso de cualquier medida de control única tenga éxito y una comprensión más detallada de la interacción hospedero-patógeno, el microambiente en el que perdura el hongo y sus competidores microbianos en el hospedero es esencial. El costo actual de la comercialización de un nuevo fungicida o agente de control biológico es tan alto que sólo los cultivos importantes atraen el interés suficiente de la agroindustria (Williamson *et al.*, 2007).

Debido a su importancia en todo el mundo y a la disponibilidad de herramientas genético-moleculares para estudiarlo, este hongo se ha convertido en el patógeno fúngico necrotrófico más estudiado en forma extensiva (Williamson *et al.*, 2007).

3.2. Resistencia a fungicidas

En los últimos años, frecuentes episodios de resistencia a fungicidas que desafían la eficacia del control químico sobre el moho gris han sido observados en poblaciones de *B. cinerea* en cultivo de frutilla en Alemania, Grecia, Italia y los Estados Unidos (Rupp *et al.*, 2017).

3.3. Patogenicidad

B. cinerea produce una gama de enzimas degradantes de paredes celulares, toxinas y otros compuestos de bajo peso molecular como el ácido oxálico. Nueva evidencia sugiere que el patógeno activa el hospedero para inducir la muerte celular programada como una estrategia de ataque (Williamson *et al.*, 2007).

3.4. Síntomas causados por *B. cinerea* en frutilla

B. cinerea es responsable de un amplio rango de síntomas y estos no pueden ser fácilmente generalizados en todos los órganos y tejidos de la planta (Williamson *et al.*, 2007).

El síntoma más evidente y frecuente es la podredumbre húmeda de frutos, que comienza cuando los mismos comienzan a cambiar de color e incrementa su incidencia notoriamente en frutos maduros. Son lesiones acuosas, castaño claro, con límites difusos. En general comienzan en el pedúnculo, por debajo del cáliz, aunque pueden aparecer en cualquier lugar del fruto (**Figura 2**). La podredumbre progresa con rapidez, especialmente en frutos sobremaduros. Las frutillas sanas se contagian rápidamente cuando están en contacto con las enfermas y también cuando reciben algún tipo de microherida, lo que es frecuente durante la cosecha.

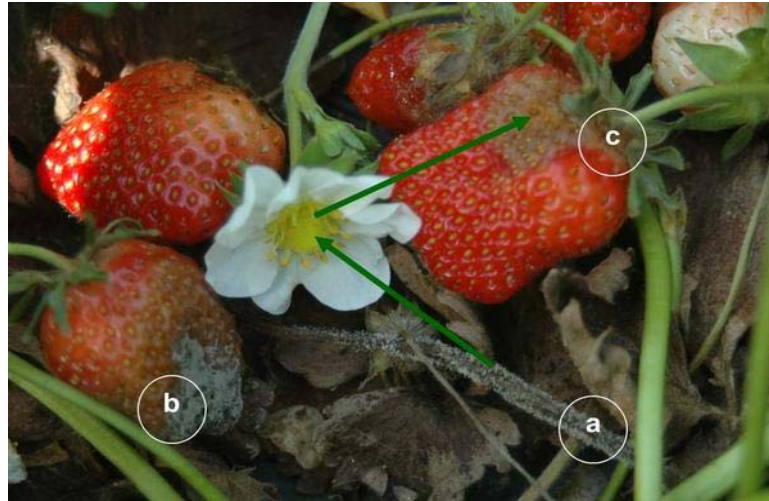


Figura 2. Moho gris en diferentes partes de la planta: a) esporulaciones en un peciolo muerto; b) infección de fruto desde tejidos enfermos; c) infección de fruto a través de la flor.
Fuente: Louws (2014)

Sobre la podredumbre aparece rápidamente un moho pulverulento de aspecto aterciopelado que comienza siendo blanquecino, especialmente con poca luz, pero rápidamente se torna gris (**Figura 3**). El mismo constituye un carácter distintivo de la enfermedad. Finalmente, los frutos afectados se momifican. (González, 2017).



Figura 3. Moho gris sobre frutilla, síntoma característico causado por *B. cinerea*.
Fuente: Louws (2014)

Las frutillas son susceptibles cuando las flores están totalmente abiertas y luego, cuando los frutos están maduros. Con frecuencia las flores infectadas no muestran síntomas hasta que las frutillas maduran. También puede ocurrir que las flores, e inclusive pequeños frutos, resulten infectados cuando mueren por las heladas u otras enfermedades, como la antracnosis o la podredumbre seca. En estos casos el patógeno continúa progresando por los pecíolos en forma descendente. Al llegar a la corona puede contagiar otros pecíolos y pedúnculos, desde su base y las hojas mueren. Las coronas no son afectadas, por lo que eventualmente las plantas pueden rebrotar, pero su producción se retrasa (González, 2017).

3.5. Condiciones favorables para su desarrollo

Temperaturas entre 15 y 25 °C, acompañadas de lluvias o humedad relativa mayor al 80 %. Presencia de agua sobre la planta, la fruta y el mulch (Kirschbaum *et al.*, s.f.). La persistencia de alta humedad relativa durante los períodos de floración conduce a ciclos sucesivos de infección y esporulación, dejando sin oportunidad alguna para la remoción oportuna de los frutos maduros y resultando en epidemias dañinas sin las medidas de control adecuadas (Williamson *et al.*, 2007).

3.6. Epidemiología

Los esclerocios se desarrollan dentro de tejidos muertos de la planta y representan un importante mecanismo de supervivencia en *B. cinerea*, pero son muy variables en tamaño y no son evidentes en todos los cultivos susceptibles (**Figura 4**) (Williamson *et al.*, 2007). Los pigmentos melánicos y los β -glucanos de la corteza

encapsulan el micelio interno protegiendo al esclerocio de la desecación, la radiación UV y del ataque de microorganismos por largos periodos (Backhouse y Willets, 1984).



Figura 4. Esclerocios de *B. cinerea* sobre un pecíolo de frutilla.
Fuente: Louws (2014)

El esclerocio comienza a crecer en la primavera temprana en regiones templadas y produce conidióforos y conidios multinucleados (**Figura 5**), sirviendo como una fuente de inóculo primario en ausencia de un cultivo (Williamson *et al.*, 2007). Los conidióforos suelen tener una célula basal hinchada, son robustos, altos (a menudo de 2 a 5 mm), de color marrón oscuro y con ramificaciones irregulares cerca del ápice. Los conidios (8-14 x 6-9 μm) son unicelulares, multinucleados, de forma elipsoide a obovoide y tienen una superficie lisa (**Figura 6**) (Louws, 2014). El micelio también sobrevive en restos de cosecha infectados y en algunas semillas, sirviendo como fuentes de inóculo primarias. En cultivos perennes, las hojas muertas, flores y frutos momificados contienen masas de micelio que a menudo al estar protegidos por la

canopia del cultivo, producen conidios e inician nuevos focos de infección. En cultivos fúngicos adultos, el patógeno, además, a partir de fiálides forma abundantes microconidios (Williamson *et al.*, 2007).

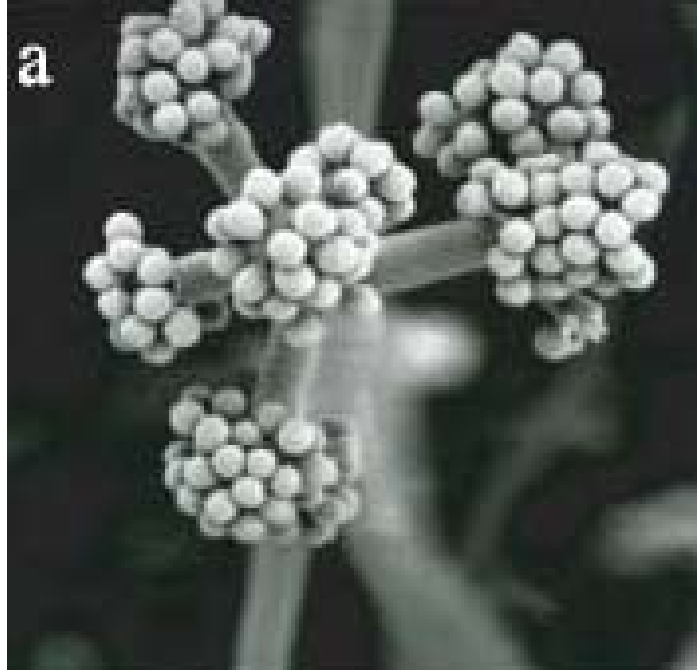


Figura 5. Micrografía electrónica de barrido de conidióforos de *B. cinerea* con conidios maduros *in situ*.
Fuente: Williamson *et al.* (2007).



Figura 6. Conidios multinucleados de *B. cinerea*.
Fuente: Louws (2014)

Los conidios generados a partir de las fuentes de inóculo primarias continúan con un definido ciclo diurno de iniciación, producción y diseminación que es regulado por fluctuaciones en la temperatura y humedad; una rápida disminución de humedad junto con un aumento de temperatura a las primeras horas de la mañana provoca el retorcimiento y secado de los conidióforos liberando así conidios en las corrientes de aire, ya sea de forma individual como en pequeños grupos. Las gotas de agua pueden también contribuir en la dispersión de conidios. La formación de los conidios es estimulada por longitudes de onda específicas; el uso del UV cercano se encuentra generalizado para inducir la esporulación en cultivos del patógeno. Sin embargo, algunos aislamientos pueden esporular en la oscuridad. Los conidios pueden moverse a través de corrientes de aire desde cultivos agrícolas vecinos, incluso la mayor parte de estos probablemente sean generados a partir de fuentes primarias dentro de cultivos. Como en muchos hongos, los conidios contienen un inhibidor propio y necesitan humedad para inducir altas tasas de germinación *in vitro*.

B. cinerea muestra una remarcada flexibilidad en su capacidad de germinar bajo diferentes condiciones ambientales y en obtener nutrientes de sus hospedantes.

Se descubrió que los conidios inoculados en seco producían tubos germinales cortos y ningún apresorio terminal evidente antes de efectuar la entrada a una cutícula hospedera intacta en las hojas, pétalos o frutos (**Figura 7**) (Williamson *et al.*, 2007).



Figura 7. Micrografía electrónica de barrido de la germinación de un conidio en ausencia de agua sobre la cara abaxial de un pétalo de rosa.
Fuente: Williamson *et al.* (2007).

B. cinerea es capaz de formar apresorios pero son diferentes a los típicos apresorios encontrados en *Colletotrichum* o *Magnaporthe*. Las germinaciones de *B. cinerea* contienen melanina en la matriz extracelular, la cual está vagamente asociada a la pared celular fúngica; pero no contienen una pared que selle el apresorio del tubo germinal, como se requeriría para permitir la generación de presiones osmóticas extremadamente altas. Por lo tanto, no es factible que los apresorios de *B. cinerea* penetren en el tejido hospedero solo por presión física (Williamson *et al.*, 2007).

En pequeños frutos, los órganos florales son importantes sitios de infección primaria, pero luego el patógeno podría permanecer inactivo por un periodo considerable antes de comenzar rápidamente a destruir tejidos de frutos maduros. Por ejemplo, en frutillas y frambuesas, los conidios germinan y las hifas crecen lentamente

dentro del tejido de transmisión de los estilos (**Figura 8**), siguiendo el camino hacia los óvulos, donde el hongo sobrevive hasta 4 semanas como saprófito hasta que el fruto madura (Mc Nicol *et al.*, 1985) (Williamson *et al.*, 2007).

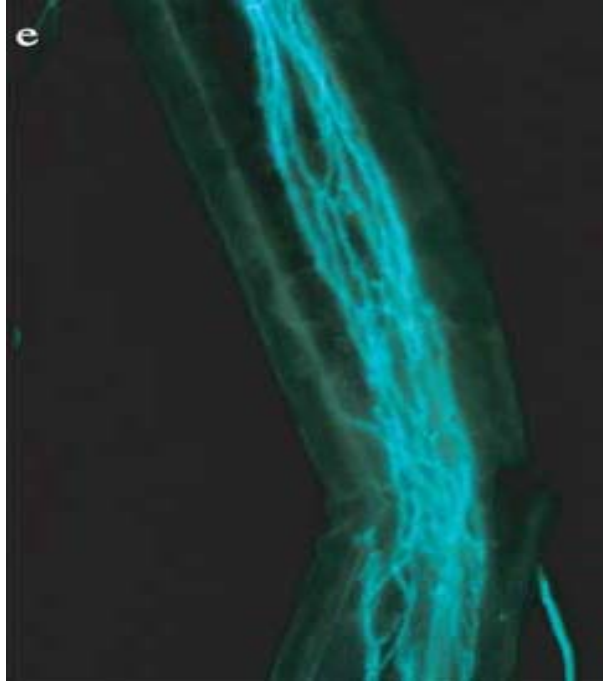


Figura 8. Infección quiescente en una flor de frambuesa: hifas de *B. cinerea* creciendo dentro del tejido de transmisión en ausencia de tubo polínico (tinción con azul de anilina y vista por microscopía de fluorescencia).
Fuente: Williamson *et al.* (2007)

La fase sexual involucra la espermatización de los esclerocios, lo que lleva a la producción de apotecios y ascas con 8 ascosporas binucleadas (Williamson *et al.*, 2007).

“El rol de los insectos vectores de *B. cinerea* ha sido reconocido solo en los últimos 20 años, en vid, por ejemplo, hay numerosos insectos conocidos por dispersar conidios viables. Aunque *B. cinerea* no es considerado principalmente como un patógeno de heridas, este puede infectarlas y al causar daño los insectos, el hongo

puede desarrollarse (Engelbrecht, 2002; Fermaud y Gaunt, 1995; Fermaud y Le Menn, 1989; Louis *et al.*, 1996)” (Williamson *et al.*, 2007).

3.8. Manejo de la enfermedad

B. cinerea es difícil de controlar porque tiene una gran variedad de modos de ataque y diversos hospedantes como fuentes de inóculo, pudiendo sobrevivir en el corto plazo como micelio y/o conidios y por largos períodos como esclerocios en restos de cosecha (Williamson, *et al.*, 2007).

El control de las enfermedades de *Botrytis* se ve favorecido con la remoción de restos infestados e infectados de cultivos y almacenamientos; así como también por una apropiada aireación y un rápido secado (reducción de humedad) de las plantas y sus productos (Agrios, 2005).

Las medidas para el manejo de las enfermedades causadas por *B. cinerea* según FAUBA (s.f.) incluyen:

- Utilización de variedades resistentes o de mejor comportamiento
- Eliminación de tejidos vivos, residuos de plantas y frutos infectados; esto ayuda a disminuir la carga de inóculo inicial
- Evitación de altas densidades de plantaciones para lograr buena ventilación y facilitar el secado del follaje y frutos luego de una lluvia o rocío.
- Fertilización adecuada para mantener un balance adecuado de nutrientes.
- Control químico desde floración si las condiciones son propicias para el desarrollo del hongo (follaje mojado y temperaturas mayores a 15 °C). Utilizar Buenas Prácticas Agrícolas para evitar el surgimiento de la resistencia a fungicidas.

- Control biológico con productos a base de *Trichoderma* y *Bacillus subtilis* en primavera.
- Uso de atmósfera controlada (AC) o atmósfera modificada (AM) como complemento a los adecuados procedimientos de manejo de la temperatura y humedad relativa en postcosecha.

4. *Penicillium*

“*Penicillium* es uno de los géneros de hongos de deterioro más comunes que crecen sobre los más diversos substratos: granos, paja, cueros, frutas, etc. La importancia que tienen estos mohos en la alimentación humana y animal está dada por su capacidad de causar deterioro y producir toxinas (Pitt y Leistener, 1991). Cuando encuentra las condiciones óptimas para su crecimiento, como actividad del agua y nutrientes necesarios, es un hongo con suma persistencia y de difícil eliminación. Tiene la capacidad de crecer sobre alimentos preparados o sus materias primas ya sean de origen animal o vegetal (Carrillo, 2003)” (Ortiz-Rivera, *et al.*, s.f.). “Se encuentra distribuido en la naturaleza encontrándose en el suelo, vegetación caída y agua, en forma de conidios sobrevive de una estación a otra (Sánchez y Orrego, 2006)” (Guamán Salán, 2017).

Tanto *Penicillium* como *Botrytis*, “al ser hongos de postcosecha son dependientes de nutrientes, todos ellos son hongos necrotróficos que se desarrollan de mejor manera en las heridas de las frutas que son fuentes de los nutrientes que requieren estos hongos (Mendez y Mondino, 1999)” (Guamán Salán, 2017).

4.1. Características del patógeno

La ubicación taxonómica del género *Penicillium* es la siguiente: Eukaryota – Opisthokonta – Fungi – Dikarya – Ascomycota – Saccharomyceta – Pezizomycotina – Leotiomyceta – Eurotiomycetes – Eurotiomycetidae – Eurotiales – Aspergillaceae – *Penicillium* (National Center for Biotechnology Information, 2021).

Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides (**Figura 9**). Las ramificaciones de los tipos de conidióforos del género *Penicillium* se ubican formando verticilos (Carrillo, 2003). “Si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado. Las ramificaciones de un pincel poliverticilado son ramas, rámulas, médulas y fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas, y en algunas especies se aprecia claramente con el microscopio óptico (Webster, 1986)” (Carrillo, 2003).

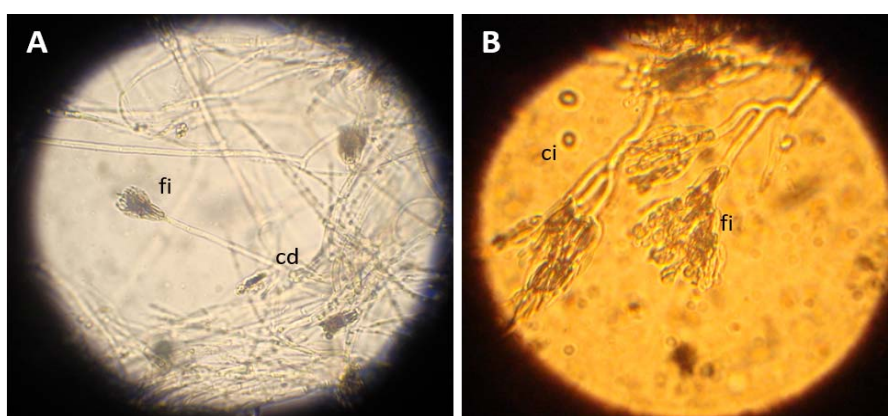


Figura 9. Estructuras de *Penicillium* sp (40X), conidióforos: cd; fiálides: fi; conidios: ci
Fuente: Cátedra de Fitopatología FCA-UNLZ

“Los filamentos o hifas alcanzan un diámetro entre dos o tres micrómetros y tienen septos con un poro central que no es visible al microscopio óptico. Las paredes del estípote, las ramas o las médulas pueden ser lisas, rugosas o equinuladas. La pared de las fiálides es siempre lisa. Las fiálides pueden tener forma de ánfora o bien ser casi cilíndricas con la porción apical en forma de cono. El tamaño máximo de las fiálides es de 15 mm y la parte terminal no supera los 3 mm de largo. Los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos que en masa se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris. La pared de los conidios es lisa o rugosa según las especies (Webster, 1986)” (Carrillo, 2003).

“Las cepas de *Penicillium* con reproducción sexuada corresponden a los géneros teleomórficos *Eupenicillium* que forma cleistotecios con pseudoparénquima constituido por células de pared engrosada, y *Talaromyces* que presenta los ascos rodeados de hifas entrelazadas formando la delgada pared del gimnotecio (Pitt y Hocking, 1997)” (Carrillo, 2003).

4.2. Condiciones favorables para su desarrollo

Los penicilios crecen sobre los alimentos preparados o sus materias primas, ya sean de origen vegetal o animal, si hallan la actividad del agua y los nutrientes necesarios. Las temperaturas óptimas para su desarrollo se encuentran entre los 20 y 30 °C aproximadamente, siendo el rango de temperatura límite muy diverso dependiendo de la especie. En cuanto a la actividad del agua, los valores óptimos rondan los 0,99, aunque el nivel mínimo puede llegar a ser hasta 0,80 en algunas especies (**Tabla 1**) (Carrillo, 2003).

Tabla 1. Temperatura y actividad del agua necesarias para el crecimiento de algunas especies de *Penicillium* (Corey 1997, Lacey 1989).

ESPECIES	TEMPERATURA °C		ACTIVIDAD DEL AGUA	
	RANGO	ÓPTIMO	MÍNIMA	ÓPTIMA
<i>P. aurantiogriseum</i>	-2 a 32	23	0,81 - 0,83	0,98
<i>P. brevicompactum</i>	12 - 30	23	0,80 - 0,82	0,99
<i>P. citrinum</i>	<5 - 37	26 - 30	0,80 - 0,84	
<i>P. commune</i>	0 - 37	25	0,85	
<i>P. digitatum</i>	6 - 37	20 - 25	0,90	0,99
<i>P. expansum</i>	-3 a 35	25 - 26	0,82 - 0,83	0,99
<i>P. islandicum</i>	10 - 42	31	0,83 - 0,86	
<i>P. roquefortii</i>	<5 - 35	25	0,83	0,99
<i>P. verrucosum</i>	0 - 31	20	0,80	

Fuente: Carrillo (2003).

4.3. Micotoxinas

“Las especies de penicilios producen varios metabolitos secundarios, entre ellos ácido ciclopiazónico, ácido penicílico, cicloclorotina, citroviridina, citrinina, griseofulvina, ocratoxina A, patulina, penitrem A (Pitt y Hocking, 1997)” (Carrillo, 2003). “Todas estas sustancias son originadas por los hongos para afianzarse en su ambiente natural inhibiendo a otros organismos que compiten por el substrato. Las micotoxinas tienen diversa estructura química, su peso molecular es relativamente bajo y se difunden en el medio. Algunas existen en cantidades significativas en el ambiente natural como para influir en la salud del hombre y otros animales, pero es prácticamente imposible inactivarlas por los tratamientos térmicos que se aplican corrientemente en la elaboración y conservación de los alimentos (Samarajeewa, 1991)” (Carrillo, 2003).

5. *Trichoderma harzianum*

“El género *Trichoderma* se encuentran entre los agentes fúngicos de biocontrol más estudiados y se utilizan con éxito como bioplaguicidas y biofertilizantes en la

producción de plantas de invernadero y de campo (Harman *et al.*, 2004)” (Vinale *et al.*, 2006). Estas aplicaciones están relacionadas con su capacidad para controlar las enfermedades de las plantas y promover su crecimiento y desarrollo. Además, este hongo se considera un controlador biológico efectivo en enfermedades postcosecha de la frutilla, pudiéndose aplicar antes de la cosecha para disminuir pérdidas durante el transporte y su estadía en las fruterías (Guédez *et al.*, 2009). La utilización de *Trichoderma* como agente de control biológico (ACB), contribuye tanto a favorecer la sanidad, el rendimiento y la inocuidad de los productos agrícolas, como a disminuir el impacto ambiental causado por el uso frecuente de productos químicos para el control de plagas y enfermedades de las plantas (Sandoval y Belesansky, 2020).

“Por ser un hongo habitante natural del suelo permite trabajar con cepas nativas, aisladas del lugar donde desarrollará su actividad biocontroladora y promotora del crecimiento, no alterando la composición cualitativa del suelo sino la cuantitativa llevando progresivamente al equilibrio dinámico perdido por la realización de prácticas culturales poco adecuadas (Zapata y Murillo, 2010)” (Murillo *et al.*, 2016).

5.1. Características del hongo

La ubicación taxonómica del hongo *Trichoderma harzianum* es la siguiente: Eukaryota – Opisthokonta – Fungi – Dikarya – Ascomycota – Saccharomyceta – Pezizomycotina – Leotiomyceta – Sordariomyceta – Sordariomycetes – Hypocreomycetidae – Hypocreales – Hypocreaceae – *Trichoderma* (National Center for Biotechnology Information, 2021).

“*Trichoderma* forma conidióforos erectos, hialinos, ramificados y no verticilados, en grupos o solitarios; fiálides en forma de pera, únicas o en grupos, hinchadas en la

región central y delgadas en el ápice. El ángulo de inserción entre las fiálides y los conidióforos es recto; con conidios unicelulares oblongos o sub oblongos, lisos o equinulados. De color verde o hialinos y se presentan en masas en los ápices de las fiálides (Rifai, 1969; Samuels, 2006)” (Sandoval y Belesansky, 2020) (**Figura 10**).

“Las colonias son de crecimiento rápido y coloración - blanca, verde, amarillo, verdosas -, donde las áreas con conidios se presentan con anillos concéntricos (**Figura 11**), con el revés de las colonias usualmente no coloreado, amarillo o amarillo verdoso (Barnett y Hunter, 1972)” (Sandoval y Belesansky, 2020).

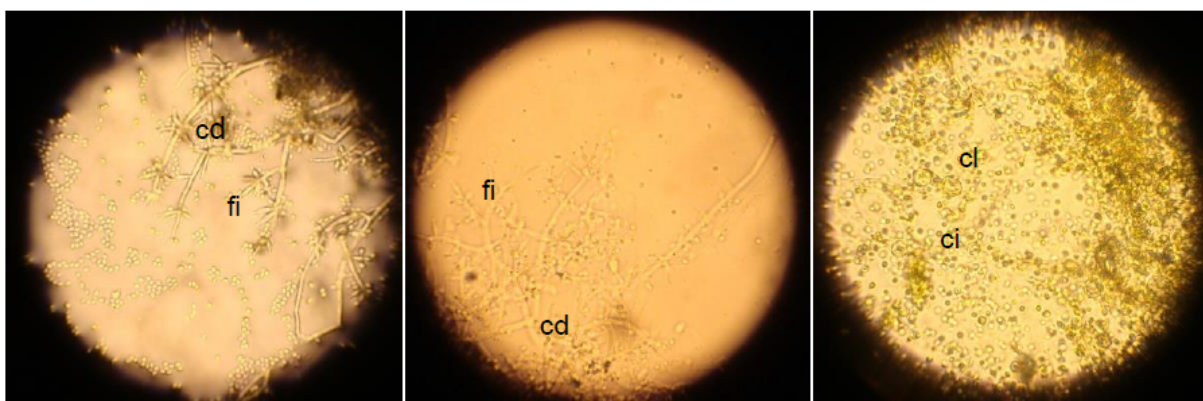


Figura 10. Estructuras de *Trichoderma sp* (40X), conidióforos: cd; fiálides: fi; conidios: ci; clamidosporas: cl.
Fuente: Sandoval y Belesansky (2020)



Figura 11. Colonias de distintos aislamientos de *Trichoderma sp*. Sobre medio de cultivo APG.
Fuente: Sandoval y Belesansky (2020)

5.2 Antecedentes de *Trichoderma* en control biológico

Ezzyyani *et al.* (2004) mencionan que el género *Trichoderma* es uno de los hongos antagonistas más utilizados para el control de enfermedades fúngicas, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores.

“Las cepas de *Trichoderma* utilizadas como agentes de biocontrol muestran diferentes mecanismos de acción en sus interacciones antagonistas con hongos patógenos. Estos incluyen antibiosis, mediante la producción de una variedad de compuestos con actividad antibiótica (Ghisalberti y Sivasithamparam 1991), micoparasitismo o hiperparasitismo (Ayers y Adams, 1981), competencia por nutrientes (Chet, 1987), actividad de la enzima lítica de la pared celular (Lorito *et al.*, 1996; Lorito, 1998) e inducción de resistencia sistémica a patógenos *in planta* (Harman *et al.*, 2004)” (Vinale *et al.*, 2006).

Ezzyyani *et al.* (2004) observaron que *T. harzianum* demuestra un claro efecto antagónico contra *Phytophthora capsici* en cultivos duales *in vitro* en medio agar papa dextrosa (PDA) enriquecido con laminarina-glucosa (3:1, v/v), donde aumenta su actividad antifúngica mediante la secreción del enzima hidrolítico (β -1,3-glucanasa) y posiblemente otros, sobrecreciendo y reduciendo totalmente la colonia del patógeno.

Los resultados obtenidos por Latorre *et al.* (1997) mostraron que aislamientos de *Trichoderma* resultaron antagonistas al desarrollo de *B. cinerea* en manzanas y en uvas ‘*Thompson Seedless*’, reduciendo la incidencia y la severidad significativamente.

Guédez, *et al.* (2009) por su parte, determinaron que el mecanismo de acción de *T. harzianum* como biocontrolador sobre los hongos de postcosecha: *Rhizopus stolonifer*, *Mucor spp.*, *Penicillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* y *Pythium spp.*, fue el de micoparasitismo. Las hifas de *T. harzianum* cubrieron a las hifas del hongo a controlar, alimentándose de esta manera y degradando el micelio del hongo controlado.

Murillo *et al.* (2016) probaron la capacidad de una cepa nativa de *Trichoderma* sp. como promotora de crecimiento y biocontroladora del *B. cinerea* en frutilla en un predio con un historial de alta incidencia de dicho patógeno. Concluyeron que el comportamiento de *Trichoderma* es promisorio para el manejo de *B. cinerea* en cultivo de frutilla ya que no observaron síntomas de la enfermedad. Los autores también mencionaron que la aplicación preventiva de *Trichoderma* conserva una óptima sanidad del cultivo durante su desarrollo y del fruto postcosecha; además favorece la recuperación de las plantas y su rendimiento después de haber sido afectadas por un estrés de temperatura.

6. Ricino (*Ricinus communis* L.)

El ricino (*R. communis*) se conoce también como: castor, higuera, higuera infernal, tártago, palmacristi, mamoma, mococonó o “*castor bean*” (EE. UU.). *R. communis* es una especie oleaginosa de la familia de las Euforbiáceas (*Euphorbiaceae*) que, además de su uso ornamental, es cultivada comercialmente para la obtención de un particular aceite de uso industrial, porque las semillas contienen aproximadamente un 40 % de aceite (Gandhi *et al.*, 1994). El aceite de castor se produce en todo el mundo para usos industriales como lubricantes,

productos farmacéuticos (Gandhi *et al.*, 1994), cosméticos y plásticos (Vignolo *et al.*, 1991). Las hojas, raíces y semillas se utilizan en la medicina herbal. La harina, la torta prensada y otros residuos de la producción de aceite de ricino también sirven como fuente de proteínas para piensos o fertilizantes (Franke *et al.*, 2019). “Adicionalmente, la ricina (proteína presente en la semilla) ha sido evaluada como un tratamiento potencial para cáncer (Vitetta *et al.*, 1983; Nicholson y Claustein, 1972) y VIH/SIDA (O’Neil *et al.*, 2001)” (Hamelin *et al.*, 2012)

Única especie del género. Nativa de las zonas tropicales del este de África hasta el centro de Europa, que se ha expandido y naturalizado en las zonas cálidas y templadas de todo el mundo. *R. communis* se encuentra no solo en zonas tropicales y regiones subtropicales, sino también como planta ornamental o silvestre esencialmente en prácticamente todo el mundo (Franke *et al.*, 2019). En la actualidad, la especie se encuentra naturalizada en la Argentina en diversas provincias del centro y norte del país (Keller *et al.*, 2018). En la región rioplatense crece de forma espontánea en ambientes alterados (Hurrell *et al.*, 2014).

Su centro de origen más probable es Etiopia. Debido a la gran diversidad morfológica existente, antiguamente se lo clasificaba en diferentes especies y subespecies (*R. persicus*, *R. chinensis*, *R. zanzabarinus*, *R. sanguineus* y *R. africans*) pero, debido a que entre ellas se pueden cruzar, poseen descendencia fértil y el mismo número de cromosomas, en la actualidad se considera que el género *Ricinus* es monotípico, conformado únicamente por *R. communis* (Severino *et al.*, 2012).

6.1. Características de la planta

La ubicación taxonómica de *Ricinus* es la siguiente: Eukaryota – Viridiplantae – Streptophyta – Streptonoliophytina – Embryophyta – Tracheophyta –Euphyllophyta– Spermatophyta –Magnoliopsida – Mesangiospermae – Eudicotyledons – Gunneridae – Pentapetalae – Rosids – Fabids – Malpighiales – Euphorbiaceae – Acalyphoideae – Acalypheae – *Ricinus* (National Center for Biotechnology Information, 2019).

El ricino es una especie perenne (aproximadamente 12 años), pero desde el punto de vista agronómico también se la puede manejar como una especie anual, ya que su cultivo se puede realizar en un amplio rango de condiciones agroecológicas, según el ambiente y el sistema de cosecha utilizado (De La Fuente *et al.*, 2013).

Presenta una elevada variabilidad fenotípica, que se manifiesta en el porte de la planta, la cantidad de ramificaciones, el color de sus hojas y tallos, la presencia de cera, la morfología de los racimos y características de las semillas (De La Fuente *et al.*, 2013).

Las plantas de *R. communis* pueden ser arbustos, arbolitos o subarbustos, de 1-12 m de altura (**Figura 12**), monoicos, semi-perennifolios, erectos, inermes, glabros. Raíz pivotante, que crece antes de la emergencia de las hojas cotiledonales, que puede llegar a 3-4 m si falta humedad en el suelo y no existan capas duras. Hojas de tamaño grande, de 10-30 cm de ancho y 10-50 cm de largo, alternas, simples, largamente pecioladas; láminas peltadas, palmatilobadas, nerviación palmada, de contorno suborbicular, lóbulos 5-11, ápice agudo, borde inciso-aserrado, verdes a purpúreas (**Figura 13**). Inflorescencias erguidas, paniculadas, terminales u opuestas

a las hojas (**Figura 14**). Flores unisexuales, apétalas, protóginas, rojizas a anaranjadas; flores estaminadas ubicadas hacia la base de la inflorescencia, con 3-5 sépalos y numerosos estambres ramificados; flores pistiladas ubicadas hacia el ápice de la inflorescencia (**Figura 15**), con 3 sépalos y ovario súpero, carpelos 3, lóculos 3, 1-ovulados, estilos 3-fidos. Con papilas destinadas a captar el polen. Fruto cápsula tricoca de 1-2,5 cm de largo, erizada (**Figura 16**); semillas carunculadas, de 1 a 1,5 cm, elipsoide-comprimidas, marmoreadas, oleíferas (**Figura 17**) (Hurrell *et al.*, 2014.).



Figura 12. Aspecto de la planta entera de *R. communis*.
Fuente: Belesansky (2019)



Figura 13. Variaciones en el aspecto de las hojas de *R. communis*
Fuente: Belesansky (2019)



Figura 14. Aspecto de las inflorescencias de *R. communis*
Fuente: Belesansky (2019)



Figura 15. Detalle de las flores femeninas y masculinas de *R. communis*
Fuente: Belesansky (2019)



Figura 16. Frutos en diferentes estados de madurez de *R. communis*
Fuente: Belesansky (2019)



Figura 17. Aspecto de las semillas de *R. communis*
Fuente: Belesansky (2019)

6.2. Componentes tóxicos

A partir de *R. communis*, se han aislado e identificado como tóxicos varios componentes, por ejemplo, la altamente tóxica ricina (ricina D, RCA60, RCA-II), la aglutinina de *R. communis* menos tóxica, pero altamente homóloga (RCA120, RCAI), y los alcaloides ricinina y nudiflorina, así como compuestos alergénicos (Franke *et al.*, 2019) (**Figura 18**). “Existen diversas variedades (cultivares) de *Ricinus communis*. Además, las propiedades de los componentes de la planta y las semillas están influenciadas por la región geográfica, la estación, el período de crecimiento de la planta, el momento de la cosecha de los frijoles o el contenido de humedad (Hänsel *et al.*, 1994; Audi *et al.*, 2005; Lopez Nunez *et al.*, 2017). Por lo tanto, se ha descrito una variabilidad algo endógena en los "diferentes cultivares", también con respecto al contenido de proteínas (por ejemplo, Despeyroux *et al.*, 2000; Sehgal *et al.*, 2010)” (Franke *et al.*, 2019).

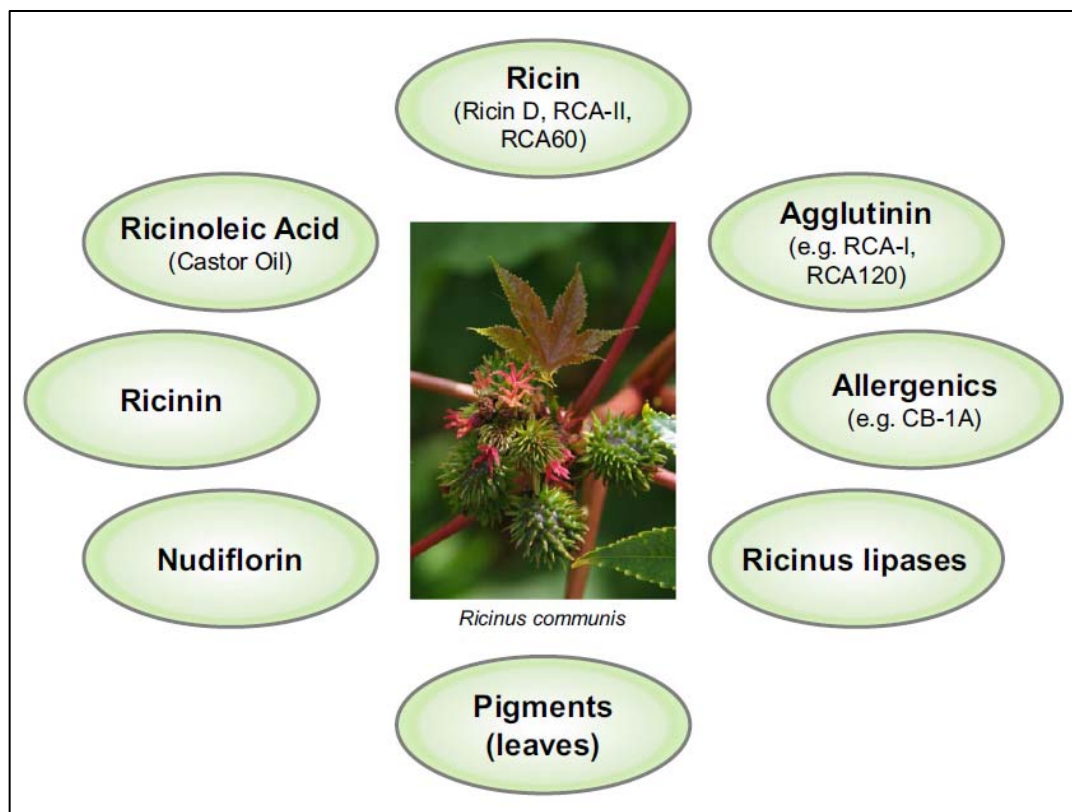


Figura 18. Descripción esquemática de los principales componentes de la planta *R. communis*
Fuente: Franke *et al.* (2019)

6.2.1. Ricina

La ricina es una potente toxina proteica glicosilada presente en los granos del ricino *R. communis*. Es una de las proteínas más tóxicas conocidas tras la exposición a gran variedad de rutas, como inyección, ingestión e inhalación (tanto como aerosol o polvo) (Feldberg *et al.*, s.f.).

“La ricina existe en diferentes isoformas, según el tipo de semilla (tamaño, forma) y la variedad de planta de la que se purifica (Despeyroux *et al.*, 2000; Griffiths *et al.*, 2007; Sehgal *et al.*, 2010). La ricina A, B, C, D y E se han descrito en la bibliografía (Ishiguro *et al.*, 1971a, b; Lin y Liu, 1986; Araki y Funatsu, 1987). El nombre ricina se

refiere a ricina D, la cual se purificó mediante filtración en gel y cromatografía de celulosa (Ishiguro *et al.*, 1971a, b).” (Franke *et al.*, 2019).

Pertenece a un grupo de toxinas de 2 cadenas denominado RIP-II (*Ribosome Inactivating Protein*), es decir, al grupo de las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo 2, las cuales inhiben la síntesis de proteínas, causan falla respiratoria y muerte (**Figura 19**). Está compuesta por dos subunidades polipéptidas, A y B, de aproximadamente 32 kDa cada una, unidas por un puente disulfuro (Feldberg *et al.*, s.f.). La cadena o subunidad A posee actividad enzimática N-glicosidasa, inhibe la síntesis de proteína inactivando de manera irreversible los ribosomas eucarióticos a través de la remoción de un único residuo de adenina de un tetrabuclé GAGA del ARN ribosomal 28S contenido en la subunidad 60S. Este proceso evita la unión del factor de alargamiento 2 al ribosoma, lo que lleva a la detención de la síntesis de proteínas (Feldberg *et al.*, s.f.; Audi *et al.*, 2005). La subunidad B de la ricina es una lectina, responsable de la entrada de la cadena A en la célula, a través de su unión a los residuos de galactosa en la superficie celular y la posterior endocitosis (Feldberg *et al.*, s.f.).

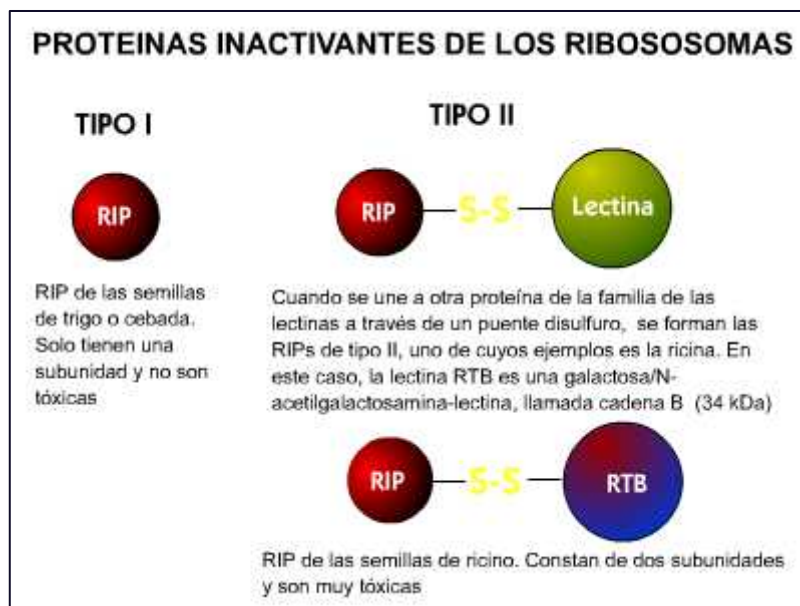


Figura 19. Características de las Proteínas Inactivadoras de Ribosomas (RIB).
Fuente: Instituto Químico Biológico (2011)

La toxicidad resulta de la inhibición de la síntesis de proteínas, pero se observan otros mecanismos, incluyendo vías de apoptosis, daño directo a la membrana celular, alteración de la estructura y función de la membrana, y liberación de mediadores inflamatorios de citoquinas (Audi *et al.*, 2005) (**Figura 20**).

La amplia disponibilidad de la planta, la facilidad de extracción de la ricina a partir de sus semillas, combinada con su alta toxicidad, hacen de la ricina un agente probable para el bioterrorismo (Feldberg *et al.*, s.f.). Es considerada un químico de alto riesgo para los seres vivos bajo la Organización para la Prohibición de las Armas Químicas (OPAQ) y también está clasificada por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) como un agente biológico Categoría B. Las sustancias de esta clase presentan una facilidad moderada de diseminación, la intoxicación da lugar a una morbilidad moderada y baja mortalidad y requiere vigilancia y mejora del diagnóstico (Gomes Raffagnato *et al.*, 2019).

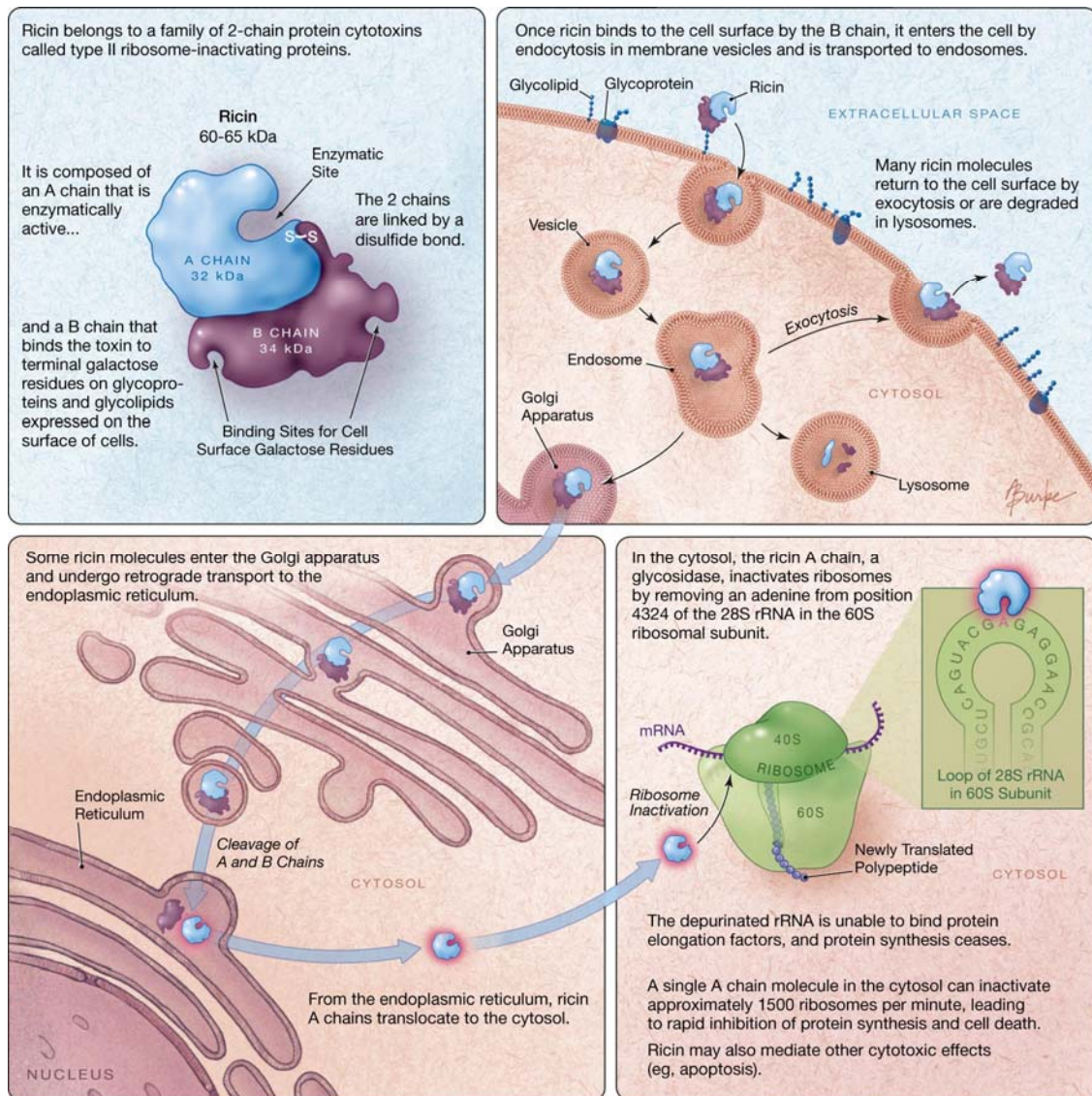


Figura 20. Mecanismo de acción de la ricina.
Fuente: Audi *et al.* (2005).

6.2.2. Aglutinina *Ricinus communis* (RCA)

La planta de ricino también contiene otra glucoproteína lectina, la aglutinina *Ricinus communis* (RCA), que, a diferencia de la ricina, no es directamente citotóxica pero tiene afinidad por los glóbulos rojos, lo que conduce a la aglutinación y posterior hemólisis. La RCA no se absorbe significativamente en el intestino y causa hemólisis

clínicamente significativa solo después de la administración intravenosa (Audi *et al.*, 2005).

Al igual que otras lectinas, la RCA se utiliza ampliamente como herramienta de investigación para detectar y apuntar a secuencias de oligosacáridos específicos. La aglutinina *Ricinus communis* I (RCA120) reconoce terminales no reductores β -D-galactosa (Gal β) y sus especificidades de interacciones con oligosacáridos neutrales y sialilados han sido bien documentados (Wang *et al.*, 2011)

Esta lectina es capaz de aglutinar las células y precipitar polisacáridos y glicoproteínas. Se ha utilizado para la digestión, enriquecimiento y desglicosilación de glicopéptidos de clara de huevo de gallina (CEW). También se ha utilizado como proteína modelo de unión a carbohidratos (Merck, 2021).

La ricina y la RCA son sintetizadas en las células del endosperma de las semillas maduras y almacenadas en una vacuola. Cuando la semilla germina, las toxinas son destruidas en unos pocos días por hidrólisis. La síntesis de la ricina se inicia como un preprolipéptido que contiene las dos cadenas A y B. La secuencia señal de la terminación NH₂ del péptido se fija al receptor del canal de retículo endoplásmico donde es removida. Seguidamente se inicia la síntesis de la proricina. A medida que el polipéptido elonga en el lumen del retículo endoplásmico, las enzimas isomerasas catalizan la formación de puentes disulfuro a medida que la proteína se pliega. La proricina experimenta otras modificaciones en el complejo de Golgi y finalmente es transportada dentro de las vesículas. La ricina no es activa hasta que es modificada por endopeptidasas que dejan sólo las cadenas A y B unidas por un puente disulfuro (**Figura 21**). De esta forma, la planta evita que la ricina envenene sus propios

ribosomas en el caso de que alguna molécula de proricina pasase accidentalmente al citoplasma (IQB, 2011).

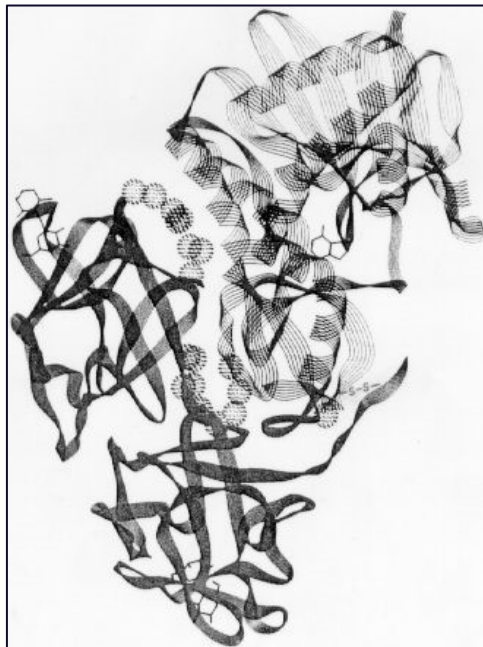


Figura 21. Estructura de la ricina
Fuente: Instituto Químico Biológico (2011)

6.2.3 Ricinina

La ricinina es una toxina alcaloidal presente en pequeñas cantidades en todas las partes de la planta, incluidas las hojas y el pericarpo de los frutos (las semillas poseen aproximadamente 0,2 % del alcaloide (Franke *et al.*, 2019)). En modelos experimentales con ratones, la ricinina causa convulsiones y subsecuentemente la muerte; se presume que el mecanismo de acción se basa en el aumento de la liberación de glutamato y la inhibición del receptor ácido γ -aminobutírico postsináptico subtipo A en el cerebro (Audi *et al.*, 2005).

Dado que la ricinina se puede coextraer con la ricina, puede ser utilizada como biomarcador para evaluar una posible intoxicación por ingesta de semillas de ricino o

exposición a la ricina sin purificar, porque este alcaloide se excreta fácilmente en la orina (Hamelin *et al.*, 2012). “Además, es estable en la orina humana cuando se calienta a 90 °C durante 1 h, así como cuando se almacena a 25 °C, 5 °C o - 20 °C durante 3 semanas (Johnson *et al.*, 2005)” (Franke *et al.*, 2019).

“Las hojas en polvo de la planta se han utilizado para repeler pulgones, mosquitos, moscas blancas y ácaros de la roya, probablemente debido a la presencia del alcaloide ricinina (Olaifa *et al.*, 1991; Rana *et al.*, 2012)” (Franke *et al.*, 2019). De hecho, se demostró que el alcaloide actúa como repelente contra insectos, por ejemplo, la hormiga cortadora de hojas (*Atta sexdens rubropilosa*) (Bigi *et al.*, 2004).

6.2.4 Otros compuestos

Además de los compuestos anteriormente mencionados, *R. communis* es rico en una variedad diversa de fitoquímicos bioactivos como: alcaloides, flavonoides, terpenos, saponinas, compuestos fenólicos como kaempferol, ácido gálico, rutina, lupeol, ácido ricinoleico, pineno, tuyona y ácido gentísico (Abdul *et al.*, 2018). Estos compuestos poseen múltiples aplicaciones farmacológicas, tales como tratamientos contra el cáncer, antivirales, antidiabéticos, antioxidantes, antiinflamatorios, etc. (Figura 22).

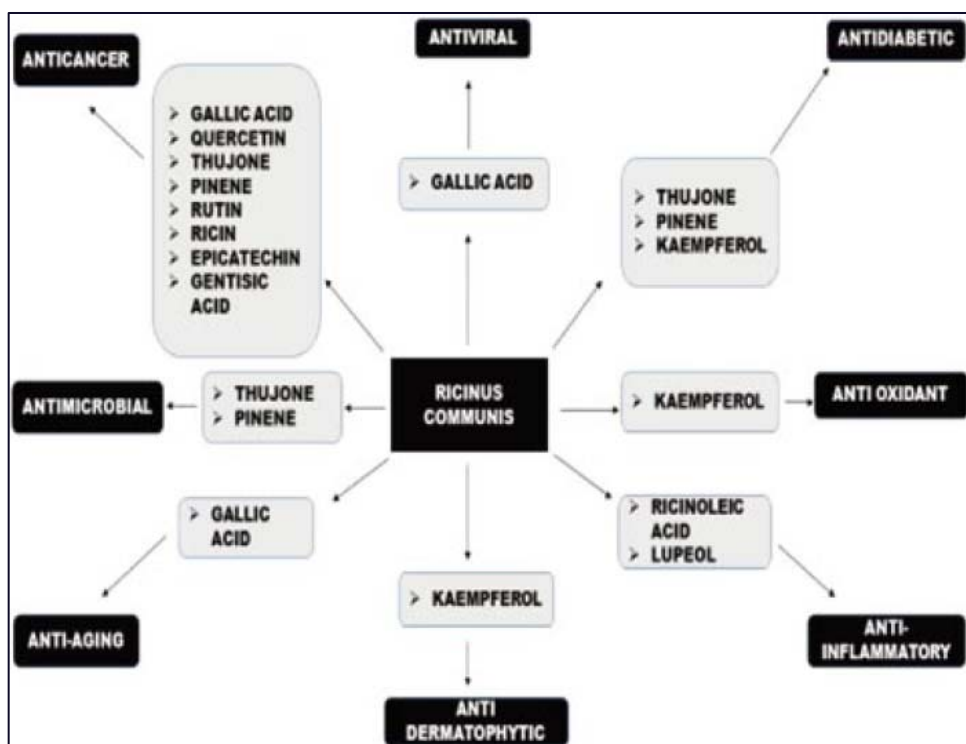


Figura 22. Fitoquímicos de *R. communis* y su actividad farmacológica.
Fuente: Abdul *et al.* (2018)

6.3. Aceite

El aceite de ricino prensado en frío puede contener hasta un 90% de ácido ricinoleico, como triglicérido del ácido graso insaturado hidroxilado (IUPAC, ácido (9Z, 12 R) -12-hidroxi octadec-9-enoico) (Franke *et al.*, 2019). “Además del ácido ricinoleico, el aceite de ricino posee 4% de ácido linoleico, 3% de oleico, 1% de esteárico y menos del 1% de linolénico (Patel *et al.*, 2016)” (Franke *et al.*, 2019). Por otro lado, van Aller y Pessoney patentaron en 1983 ciertos alguicidas específicos para el control de cianobacterias (algas verdeazuladas), dentro de los cuales se encuentran el ácido ricinoleico, con un notable control de *Anabaena* sp. en concentraciones de 10 ppm; y el ricinoleato de sodio, la sal de sodio del ácido ricinoleico, con resultados favorables contra géneros como *Lyngbya*, *Cylindospermum* y *Tribonema*, no así con

los géneros *Chlorella* (crecimiento débilmente inhibido), *Haematococcus* (crecimiento estimulado), *Stigeoclonium* (crecimiento sin cambios) (US 4398937, 1983). Estos organismos están asociados por lo general con problemas de sabor y olor en cuerpos de agua.

7. Normativa sobre la utilización de agroquímicos

7.1. Utilización de agroquímicos

El término “agroquímicos” se refiere a las sustancias o mezclas de sustancias destinadas a controlar o evitar la acción de plagas agrícolas, regular el crecimiento de las plantas, defoliar y desecar o proteger del deterioro, el producto o subproducto cosechado (**Figura 23**) (Garcia y Lazovski, 2011) (Pacheco y Barbona, 2017).

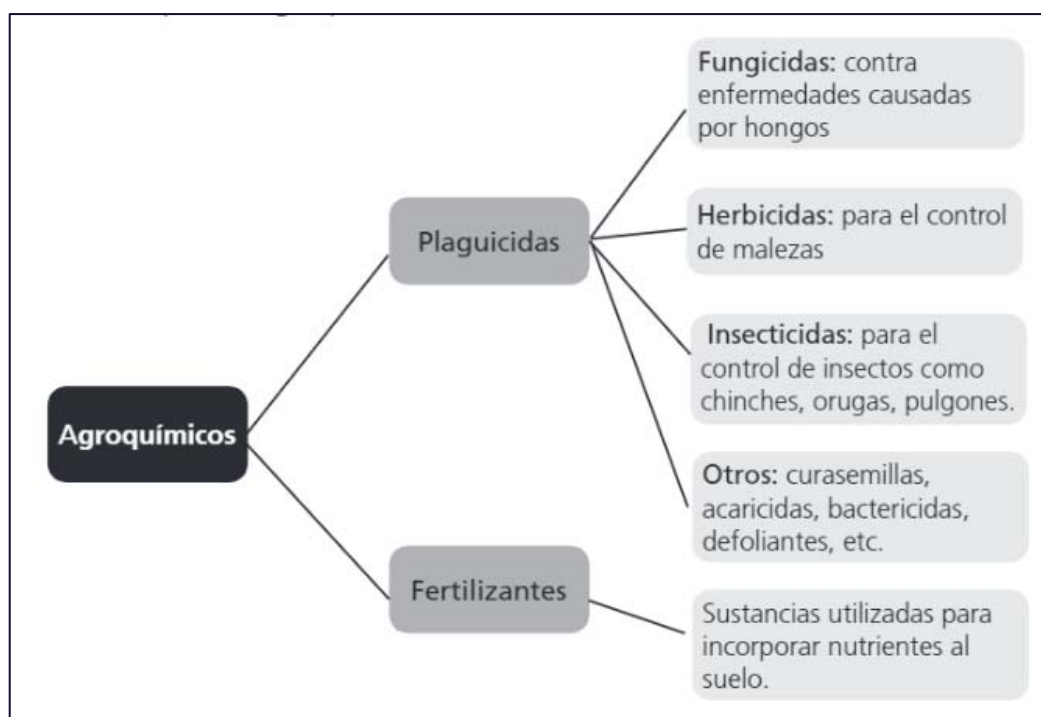


Figura 23. Tipos de agroquímicos
Fuente: Mangasco & Di Paola (2015)

A nivel mundial, cada año, en todos los campos de cultivo se aplican millones de toneladas de agroquímicos. Solo en el 2018, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que en el mundo se usaron más de 4,1 millones de toneladas de pesticidas, que corresponde a un 33 % más que en el 2000. De esa cantidad, Argentina utilizó alrededor de 84000 toneladas en el 2000, aumentado a casi 173000 toneladas en el 2018, es decir, un incremento superior al 105 %.

Según la definición de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO (1986), Plaguicida es “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga incluyendo: los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y subproductos o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o a agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes y después de la cosecha para proteger al producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales.”

En la Argentina el mercado de agroquímicos, o también llamados productos fitosanitarios, presenta una amplia gama de principios activos cuya procedencia es mayoritariamente importada de otros países productores. Si bien se sintetizan algunos productos, la gran mayoría sólo son formulados localmente (Pórfido *et al.*, 2014).

En la República Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) es la autoridad que regula la clasificación y etiquetado de los productos fitosanitarios, entre otras cuestiones relacionadas con este tipo de productos. SENASA clasifica los productos formulados e ingredientes activos de los productos fitosanitarios de acuerdo con los estudios toxicológicos presentados por los registrantes (Pina, 2012)

Los estudios toxicológicos considerados son:

1. Estudio de Toxicología Oral Aguda (Dosis Letal 50)
2. Estudio de Toxicología Dermal Aguda (Dosis Letal 50)
3. Estudio de Toxicología Inhalatoria Aguda (Concentración Letal 50)
4. Estudio de Irritación Ocular
5. Estudio de Irritación Dermal
6. Estudio de Sensibilización

La Resolución SAGPyA 350/1999 estableció la clasificación toxicológica de los productos de acuerdo con el tipo de formulación y a las características de los productos formulados, tomando en consideración diferentes estudios toxicológicos. A partir de los estudios de toxicidad oral aguda y dermal aguda, se obtiene la categoría

o clase toxicológica para dichas vías de exposición. La categoría de mayor peligro es la que se considera para la clasificación del producto formulado. La categoría define la clasificación del peligro, el color de la banda, el símbolo del peligro y las palabras que figurarán en la banda (Pina, 2012). Estos estudios están basados en la peligrosidad estimada a partir de la DL 50 (dosis letal 50) aguda oral o dermal. Este valor se refiere a la “dosis, calculada estadísticamente, de un agente tóxico (sustancia, elemento o compuesto químico y agente físico) que se espera que produzca la muerte del 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas” (Pina, 2012).

La clase toxicológica (**Tabla 2**) va desde: I (Extremadamente tóxico, banda roja), Ib (altamente tóxico, banda roja), II (moderadamente tóxico, banda amarilla), III (ligeramente tóxico, banda azul) y IV (producto que probablemente no presente riesgos agudos en las condiciones normales de uso, banda verde). El riesgo final depende, además, de las condiciones de aplicación tales como: momento, forma, condiciones climáticas, manipuleo y destino de envases y residuos tóxicos, distancia entre punto de aplicación y los centros poblados, entre otras.

Tabla 2. Clasificación toxicológica según riesgos y valores de DL50 aguda de productos formulados

	ORAL	DERMAL
Ia Extremadamente peligroso	< 5	< 50
Ib Altamente peligroso	5 a 50	50 a 200
II Moderadamente peligroso	>50 a 2000	>200 a 2000
III Ligeramente peligroso	>2000 a 5000	>2000 a 5000
IV Producto que normalmente no ofrece peligro	>5000	>5000

Fuente: Artículo 8°, Anexo I, Resolución 302/2012. SENASA

7.2. Uso del bromuro de metilo

El bromuro de metilo es un fumigante de amplio espectro de acción sobre diversas plagas, que se ha venido aplicando desde hace años en gran parte del mundo (FAO, 1998). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) define al bromuro de metilo como un gas incoloro e inodoro que se utiliza para controlar una amplia variedad de plagas en la agricultura y el transporte, incluidos hongos, malezas, insectos, nematodos (o lombrices intestinales) y roedores. Los productores agrícolas inyectan bromuro de metilo en el suelo para esterilizar el mismo antes de establecer los cultivos. Aunque el suelo se cubre con material plástico inmediatamente después de un tratamiento, del 50 al 95 % del bromuro de metilo eventualmente ingresa a la atmósfera (EPA, s.f.). Además de disiparse rápidamente a la atmósfera, el bromuro de metilo es una sustancia tóxica. La exposición humana a altas concentraciones de esta sustancia puede causar fallas en el sistema nervioso central y respiratorio y puede dañar los pulmones, los ojos y la piel (EPA, s.f.). Al ser un gas inodoro, incoloro y sin sabor, tiene un impacto directo sobre la salud humana ya que resulta imposible de detectar cuando se inhala a no ser que se encuentre mezclado con cloropicrina, un agente "alarma" (Revol Alurralde, s.f.).

Otro efecto del bromuro de metilo de gran relevancia es el de destruir la capa de ozono. La EPA categoriza al bromuro de metilo como una *Class I ozone-depleting substance* (ODS), o su traducción al castellano, "Sustancia Agotadora de la capa de Ozono (SAO)". Debido a ello, en 1987 Argentina firmó el Protocolo de Montreal en el que se comprometió a prohibir el uso de bromuro de metilo y otras sustancias que afectan la capa de ozono.

Por medio de la Resolución 77 del 2006, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) prohibió el uso en fumigación de suelos y sustratos de formulaciones que contengan más del setenta por ciento (70 %) de la sustancia activa Bromuro de Metilo o Metilbromuro o Bromo Metano. Esto es debido a que, como se mencionó anteriormente, se encuentra encuadrado dentro de los compuestos que afectan la capa de ozono y entre los que la República Argentina comprometió la reducción gradual de su uso hasta la eliminación total.

7.3. Convenio de Viena

El 13 de septiembre de 1989, en Argentina se sancionó la Ley N° 23.724 donde se aprueba el Convenio de Viena para la Protección de la Capa de Ozono, adoptado en Viena el 22 de marzo de 1985.

El Convenio de Viena para la Protección de la Capa de Ozono, ratificado por los 33 países de América Latina y el Caribe, entró en vigor en septiembre del 1988. El Convenio tiene por objetivo alentar a las Partes a promover la cooperación a través de observaciones sistemáticas, investigaciones e intercambio de información sobre el impacto de las actividades humanas en la capa de ozono y para adoptar medidas legislativas o administrativas en contra de actividades que puedan producir efectos adversos en la capa de ozono (CEPAL, s.f.)

7.4. Protocolo de Montreal

El 16 de septiembre de 1987 se firmó, bajo el auspicio de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y dentro del PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), el acuerdo internacional ambiental más exitoso y, que, gracias a

su implementación, fue el responsable de la eliminación progresiva de las Sustancias Agotadoras de la capa de Ozono (SAO). El Protocolo de Montreal establecía el 1° de enero de 1989 como fecha de inicio de vigencia para los plazos establecidos (CADEA, 2017)

El Protocolo de Montreal, firmado en la ciudad homónima de Canadá, fue suscrito inicialmente por 56 países quienes acordaron un programa gradual de sustitución y eliminación de las SAO. Argentina integró la nómina de países suscriptores del protocolo en su inicio. En la actualidad son 197 países del mundo que han adheridos y ratificado los compromisos de Montreal (CADEA, 2017).

El 10 de mayo de 1990, en Argentina se sancionó la Ley N° 23.778 donde se aprueba el Protocolo de Montreal relativo a las Sustancias que Agotan la Capa de Ozono.

8. Problema de investigación

El hongo *Botrytis* es un patógeno fúngico polífago que causa tizones de flores u hojas, caída de plantas, canchales y pudriciones en la madera, manchas foliares y pudriciones de bulbos, cormos, tubérculos y raíces (Soto, 2017). También afecta a productos almacenados.

En el caso del cultivo de frutilla *Botrytis* es el principal problema sanitario del cultivo (France, 2017). El síntoma principal se observa en los frutos maduros, donde causa una podredumbre blanda acompañada de una masa de micelio de color gris, que le da el nombre común a la enfermedad "moho gris". Para el manejo de este patógeno existen escasos fungicidas registrados para su uso en frutilla, y existen

reportes acerca de la alta capacidad de *Botrytis* para la generación de resistencia (Gepp *et al.*, 2012). En cuanto al control biológico, existen productos a base del hongo *Trichoderma* y la bacteria *Bacillus subtilis* de corta persistencia luego de la aplicación (France, 2017).

“El hongo *Penicillium spp.*, es uno de los principales géneros fúngicos reportados en cultivos de frutilla en postcosecha en países como Canadá, Estados Unidos, Inglaterra e Israel, junto a: *Aspergillus niger* Tiegh, *Botrytis cinerea* Pers, *Colletotrichum spp.*, *Mucor spp.*, *Pestalotia longisetula* Guba, *Phytophthora cactorum* (Lebert y Cohn) J. Schröt., y *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. (Sutton, 1998; Smith, 1998; Maas, 1998; Kader, 1991; Kenneth *et al.*, 1968; Crop Protection, 2001)” (Fraire Cordero, 2003). Además de ser un hongo de postcosecha, *Penicillium* es un patógeno oportunista de frutos durante el cultivo.

En este contexto, el presente proyecto plantea la utilización de cepas de *Trichoderma harzianum*, extractos hidrosolubles de semillas de ricino y aceite de ricino para el manejo de *Botrytis cinerea* y *Penicillium* en el cultivo de frutilla. Esto es, evaluar alternativas al control químico para el manejo de los hongos patógenos antes citados.

9. Objetivo

9.1 Objetivo general

Evaluar la utilización de alternativas de bajo impacto ambiental como aceite y de extractos vegetales de *Ricinus communis* (ricino) y *Trichoderma* para el manejo de *Botrytis cinerea* y *Penicillium*, patógenos del cultivo de frutilla.

9.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del aceite de ricino sobre el crecimiento y desarrollo de colonias de *Botrytis cinerea*.
- Obtener extractos de las semillas de ricino.
- Evaluar el efecto de los extractos vegetales de ricino sobre el crecimiento y desarrollo de colonias de *Penicillium sp.*
- Evaluar el efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre el crecimiento y desarrollo de colonias de *Penicillium sp.*

10. Hipótesis

El aceite de ricino tiene efecto antagónico sobre el crecimiento y desarrollo de esclerocios de *Botrytis cinerea* en pruebas *in vitro*, y extractos de ricino y aislamientos de *Trichoderma harzianum* tienen efecto antagónico sobre el crecimiento y desarrollo de *Penicillium sp.* en pruebas *in vitro*.

11. Materiales y Métodos

11.1. Aceite de ricino

Se utilizó un aceite de ricino comercial procedente de India, obtenido a partir de plantas cultivadas a campo. El método de extracción de este aceite fue por prensado en frío con posterior filtrado con papel para mantener todas las cualidades del aceite crudo.

11.2. Extractos de ricino

Los extractos de ricino se obtuvieron a partir de semillas cosechadas en diferentes momentos, entre los años 2019 y 2020, de plantas de ricino de crecimiento espontáneo ubicadas en la vía pública en diferentes puntos del Área Metropolitana de Buenos Aires, Argentina; principalmente en la Ciudad de Buenos Aires y en los municipios de Avellaneda, Lanús y Lomas de Zamora, pertenecientes a la provincia de Buenos Aires. La preparación de las muestras, soluciones y los diferentes tratamientos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora, sito en Kilómetro 2 Ruta Provincial N° 4 (ex Camino de Cintura), Llavallol, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Dado que la toxicidad del ricino se debe mayoritariamente a la presencia de ricina (Pita *et al.*, 2004), para la extracción de la misma se adaptó el protocolo de extracción de la ricina, elaborado por Harry L. Craig, Otto H. Alderks, Sally H. Diecke y Charlotte L. Karel, patentado el 23 de octubre de 1962 (US 3060165, 1962). Con respecto al protocolo original, se acotó y adaptó el proceso de purificación para evitar trabajar con sustancias en estado sólido ya que estas presentarían un mayor riesgo para el operario. De todas formas, cabe aclarar que en todo momento se cumplieron con las normas de higiene y seguridad en el laboratorio y se trabajó con los elementos de protección personal, como guantes, barbijos, lentes, entre otros.

11.2.1. Obtención de los extractos

El primer paso consistió en la obtención de la muestra inicial, para lo cual se utilizó una prensa de fabricación propia, basada en una estructura de hierro y un gato hidráulico o *cricket* (**Figura 24**), cuyo objetivo fue moler y extraer la mayor cantidad posible de aceite de las semillas de ricino. Una vez prensadas las semillas, el material resultante (**Figura 25**) se pesó y se utilizó como muestra inicial.



Figura 24. Prensa para la extracción del aceite de las semillas de ricino.



Figura 25. Material resultante tras prensar las semillas.

A continuación, se preparó una solución extractante acuosa a pH $3,8 \pm 0,1$ acidificada con ácido sulfúrico (H_2SO_4). Además, se preparó una solución de sulfato de sodio (Na_2SO_4) de 16,7 % que se llevó a pH 7 utilizando una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3). El sulfato de sodio se utilizó como agente precipitante de proteínas ya que permite un buen fraccionamiento proteico, una precipitación más rápida y permite trabajar en un rango de pH más amplio que otros agentes. Esta técnica es comúnmente denominada *salting out* y representa uno de los métodos más simples de purificar proteínas. En este paso, se trabajó en un rango de pH de 7 – 8 ya que se observó que permite una mejor recuperación de las proteínas de interés y una reducción de compuestos contaminantes (denominados por los autores como “nitrógeno no tóxico”). Finalmente se prepararon tres soluciones (Ricino I, Ricino II y Ricino III), según se describe a continuación:

Ricino I

Se pesaron 10,004 g de muestra inicial y se disolvieron en 100 ml de agua destilada a pH 3,8. Se incubó en un agitador magnético por 20 minutos (**Figura 26**) y luego se realizó un filtrado de dos etapas. El primer filtrado fue a través de algodón, para clarificar la muestra. El segundo filtrado fue por medio de un papel de filtro Whatman grado 41 (**Figura 27**). Al filtrado obtenido se le agregó 100 ml de la solución de Na_2SO_4 , se agitó manualmente y se dejó reposar la solución resultante por aproximadamente dos horas. Transcurrido el tiempo, se filtró el material suspendido con un papel de filtro Whatman grado 40. El retenido se resuspendió en 50 ml de agua destilada a pH 3,8.



Figura 26. Solución en el agitador mecánico.

WHATMAN FILTER PAPER CHART						
Filter Speed	Qualitative	Qualitative Wet-Strengthened	Ashless	Hardened	Hardened Ashless	Retention
Fast	4	114 113	41	54	541	Coarse and Gelatinous Precipitates
Medium Fast	1	111	43			Medium Crystalline
Medium	2		40	52	540	Crystalline
Slow	5 6		44 42	50	542	Fine Crystalline
Ash	0.06%	0.06%	0.01%	0.025%	0.008%	

No. 3 Thick, medium speed paper with high retention.
 GF/A Standard laboratory glass microfibre paper.
 GF/B Thicker, stronger version of GF/A.
 GF/C Very fine glass microfibre paper.
 GF/D Thick version ideal for membrane prefiltration.
 GF/F Ultra-fine filter with retention down to 0.7 μm in liquids.



Whatman[®]

FILTER PAPER

ASHLESS

100 Circles — 11.0 cm

Catalogue No. 1441 110

41

Figura 27. Detalle de los filtros Whatman N° 41.

Ricino II

Se pesaron 10,001 g de muestra inicial y se disolvieron en 100 ml de agua destilada a pH 3,8. Se utilizó el mismo proceso de filtrado descrito para ricino I. Al filtrado obtenido se le agregó 50 ml de Na₂SO₄, 50 ml de acetona y se agitó manualmente. Luego se filtró el material suspendido con un papel de filtro Whatman grado 40. Al retenido se incorporaron 50 ml de Na₂SO₄ y 50 ml de acetona, y se agitó manualmente. Posteriormente se filtró nuevamente el material suspendido con un papel de filtro Whatman grado 40; el retenido se resuspendió en 50 ml de agua destilada a pH 3,8 y finalmente se burbujeó con N₂ hasta completa evaporación del solvente.

Ricino III

Se pesaron 5,013 g de muestra inicial y se disolvieron en 50 ml de agua destilada a pH 3,8. Se incubó en un agitador mecánico por 20 minutos y luego se realizó solo un filtrado a través de algodón. Las soluciones obtenidas se conservaron en frascos color caramelo a 4 °C (**Figura 28**) hasta el momento de realización de las pruebas.



Figura 28. Soluciones obtenidas a partir de la muestra inicial según tres procedimientos.

11.3. Obtención de la cepa de *Trichoderma*

Se utilizó un aislamiento de *Trichoderma*, procedente de suelo de cultivo de frutilla aislado a través de la técnica de suelo diluido propuesta por Dhingra (1986) y conservado en agar papa glucosado (APG) al 2 % por repiques periódicos a tubos conteniendo medio fresco. Para la técnica del suelo diluido el procedimiento fue el siguiente: se tomó con una pala a 10 - 20 cm de profundidad una muestra compuesta de suelo (10 submuestras) por lote. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno rotuladas. En el laboratorio se procedió a tamizar el suelo previamente oreado con un tamiz de malla de 2 mm, embolsar, rotular y llevar a heladera. Luego se utilizó la técnica de suspensión y dilución del suelo, donde 1 g de suelo se coloca en 9 ml de solución salina estéril. A partir de esta dilución 10^{-1} se prepararon diluciones seriadas y se sembró con una pipeta estéril 1 ml en una placa de Petri conteniendo medio APG.

11.4. Obtención de cepas de hongos patógenos

Para el aislamiento de *Botrytis cinerea* y *Penicillium* sp. se partió de la siembra de explantos de frutos infectados con síntomas de podredumbre (**Figura 29**). Estos explantos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2 %, durante tres minutos, enjuagados con agua destilada estéril y sembrados en placa con medio APG al 2 %. Luego del periodo de incubación por 8 días a 21 °C (Latorre y Rioja, 2002; Lacey, 2002) se procedió a la observación e identificación de las colonias desarrolladas. A partir de las colonias con características distintivas de *B. cinerea* y de *Penicillium* sp. se obtuvieron cultivos puros a través de la siembra en placas con APG utilizando la técnica de “punta de hifa”. El inóculo necesario para las pruebas consistió en secciones de micelio, en el caso de *Penicillium*, y de esclerocios de *B. cinerea* retirados del medio de cultivo y conservados en placas estériles.



Figura 29. Fruto con síntomas de podredumbre y desarrollo micelial.

11.5. Pruebas de inhibición *in vitro*

11.5.1. Aceite de ricino

A partir del aceite puro, se obtuvieron 3 diluciones con distinta concentración (dosis) del aceite: 250, 300 y 350 ppm. Una vez determinado el volumen del aceite para cada concentración (26,1 µl, 31.3 µl y 36.5 µl respectivamente) el aceite se vertió, utilizando una micropipeta y/o un ansa calibrada, en frascos Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de APG enfriado a 37 °C. Luego se procedió a verter el medio + el aceite en placas de Petri estériles. Finalmente se procedió a sembrar en el centro de las placas un esclerocio de *B. cinerea*.

11.5.2. Extractos de ricino

Con cada uno de los extractos de ricino Ricino I, Ricino II y Ricino III se prepararon diluciones por separado con 0,5 ml en 4,5 ml de APG, que se depositaron en placas de Petri. Las placas fueron sembradas con una sección de agar conteniendo micelio y conidios de *Penicillium*.

11.5.3. Prueba de antagonismo con *Trichoderma*

La prueba fue realizada utilizando la técnica del cultivo dual, para lo cual se sembraron en el centro de cajas de Petri con medio APG 2 % una sección de 0,5 cm de un cultivo puro de *Penicillium*, enfrentada a una sección de igual tamaño del aislamiento de *Trichoderma*, con una distancia entre ambos de 4 cm.

Para cada tratamiento se sembraron tres placas e igual cantidad de placas hicieron las veces de testigo. Por lo tanto, para el caso del aceite de ricino serán 4 tratamientos (3 concentraciones de aceite + 1 testigo con solo medio APG), para los

extractos de ricino serán 4 tratamientos (3 extractos + 1 testigo – *Penicillium* individual) y para *Trichoderma*, 3 tratamientos (cultivo dual + testigos – *Trichoderma* individual y *Penicillium* individual). Las placas sembradas se incubaron durante siete días a temperatura ambiente. Durante este periodo se procedió a la medición del diámetro de las colonias, con intervalos de 24 horas. El porcentaje de inhibición fue calculado utilizando la fórmula indicada por Fakhrunnisa *et al.* (2006).

$$I = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde I = Porcentaje de inhibición en el diámetro de la colonia

R1 = Crecimiento radial del patógeno en la placa testigo (siembra individual)

R2 = Crecimiento radial del patógeno en las placas + aceite o extracto de ricino respectivamente.

Los datos fueron analizados a través de un análisis de la varianza y una prueba de Tukey utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014). El diseño experimental utilizado fue un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA).

12. Resultados y Discusión

12.1. Aceite de ricino

En las tres concentraciones de aceites probadas, 250, 300 y 350 ppm no se observó inhibición sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea*. Por el contrario, a mayor concentración de aceite, mayor fue la cantidad de esclerocios desarrollados. Por consiguiente, el aceite de ricino estimuló el crecimiento del patógeno (**Figuras 30 y 31**).

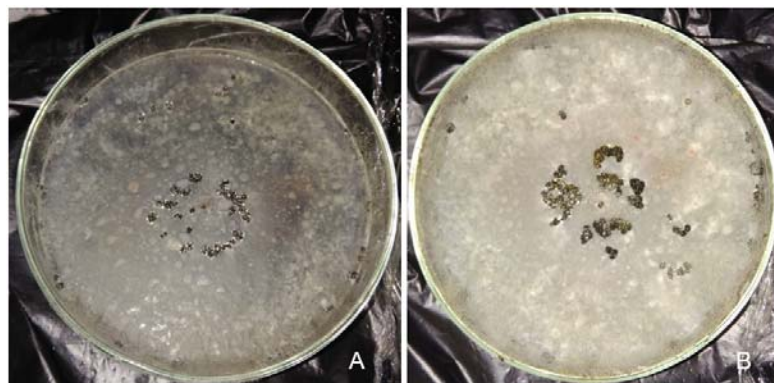


Figura 30. Desarrollo de esclerocios en concentraciones de 250 ppm (A) y 300 (B) ppm luego de la incubación.

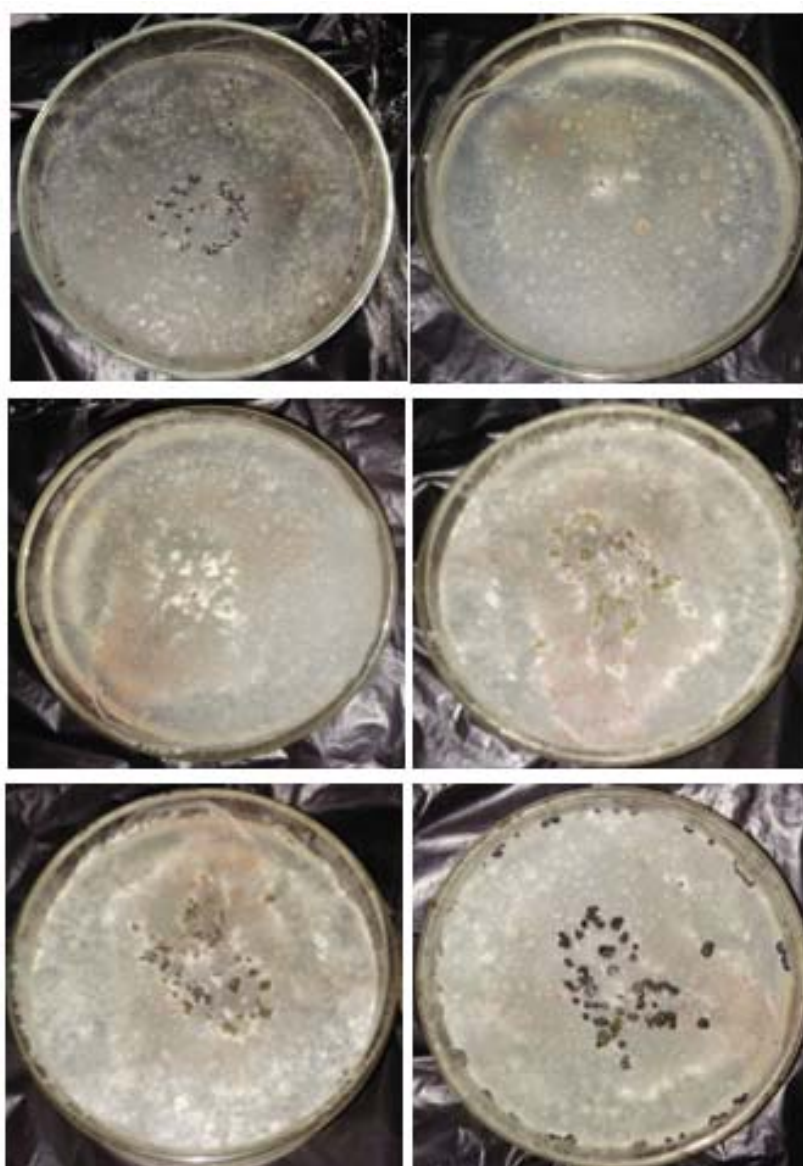


Figura 31. Evolución de la formación de esclerocios en placas adicionadas con la concentración de 350 ppm.

A partir de estos resultados, se podría inferir que el efecto de estimulación del crecimiento de *B. cinerea* causado por el aceite de ricino, y su consiguiente efecto nulo sobre el patógeno, se debería a la total eliminación de los compuestos tóxicos, que estaban presentes en las semillas, del aceite. El proceso industrial por el que se extrajo el aceite de ricino fue el prensado en frío, y al ser la ricina una proteína hidrosoluble, esta no se extrae conjuntamente con el aceite, resultando el aceite de ricino un producto seguro (Worbs *et al.*, 2011) Por lo tanto, las sustancias con actividad antagónica no estarían presentes en el aceite. Toda vez que, el control de hongos fitopatógenos se ha logrado con la utilización de extractos, incorporación al suelo de la planta completa o biopreparados, procesos que no incluyen el tratamiento térmico en su preparación (Ramos Jaramillo, 2014).

12.2. Extractos de ricino

La disminución del crecimiento de las colonias de *Penicillium* sp. fue registrada en los tres tratamientos con los extractos de ricino. El extracto Ricino III resultó el más efectivo en la disminución del crecimiento de las colonias del patógeno (**Figura 32**).

Dicho efecto podría deberse al método de extracción empleado para obtenerlo. A diferencia de los otros tratamientos con ricino, el tratamiento Ricino III se obtuvo únicamente por extracción acuosa (agua a pH 3,8) de las semillas prensadas y molidas, con un posterior filtrado simple con algodón. Por lo tanto, el extracto resultante solo estaría compuesto por sustancias hidrosolubles (la ricina es una de ellas). En los tratamientos Ricino I y Ricino II, al realizar pasos de purificación, si bien la pureza de la proteína en cuestión aumentaría, su concentración disminuye. Siempre en una purificación se recupera un porcentaje menor de lo existente anteriormente, es

decir que con cada paso de purificación se pierde cierta cantidad de la molécula de interés; y como en los tres tratamientos se llevó al mismo volumen final, esto se podría ver como una disminución en la concentración de la ricina. Además, al haber menos contaminantes, es posible que se haya perdido alguna otra molécula con actividad fungicida.

El análisis estadístico (**ver Anexo**) realizado mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en el diámetro de colonias del patógeno cultivadas en APG más extractos en comparación con el crecimiento del testigo (*Penicillium* sp. en medio APG sin adición del extracto) (**Figura 33**). Mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos con extractos de ricino (Ricino I, Ricino II y Ricino III) transcurridos los siete días de la prueba. Pero sí cabe destacar la diferencia en el avance del porcentaje de inhibición en cada tratamiento. En la **Figura 34** se observa que al día 1 de sembradas las placas tanto Ricino I como Ricino II lograron un porcentaje de inhibición cercano al 60 % (63 y 56 % respectivamente) mientras que Ricino III solo el 19 %. Al cabo de cinco días, Ricino III logró un porcentaje de inhibición del patógeno del 69 %, mientras que Ricino I logró un 61 % y Ricino II un porcentaje de inhibición mucho menor, alcanzando el 54 %. Sin embargo, al séptimo día el porcentaje se iguala estadísticamente bajo los tres tratamientos en un valor medio de 52 %.

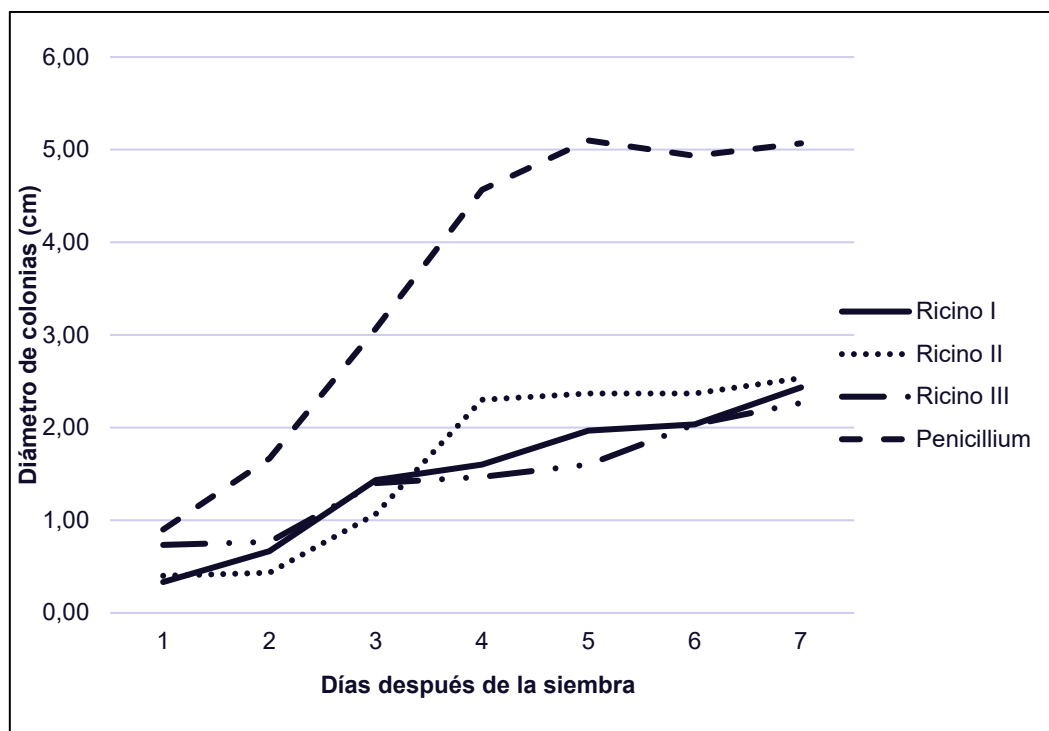


Figura 32. Crecimiento de colonias de *Penicillium* sp. bajo tres tratamientos (Ricino I, II y III) y un testigo (*Penicillium* individual).

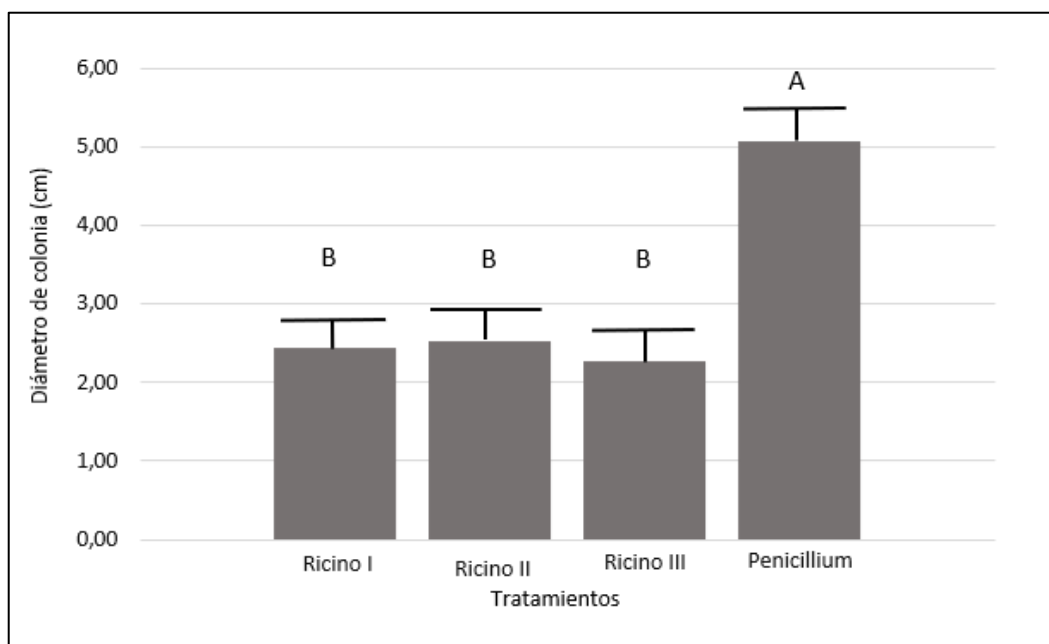


Figura 33. Diámetro de colonias de *Penicillium* sp. bajo tres tratamientos (Ricino I, II y III) y un testigo (*Penicillium* individual). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con un n muestral igual a 12. Las líneas por encima de las barras indican el error de la media.

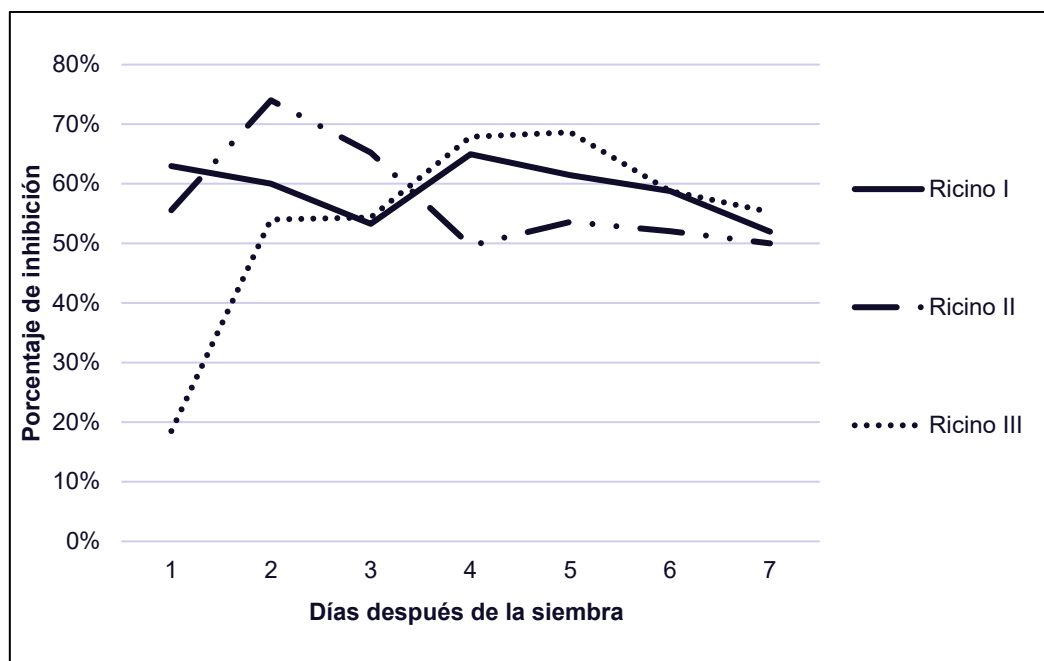


Figura 34. Porcentaje de inhibición de crecimiento de *Penicillium sp.* en medio APG bajo tres tratamientos.

12.3. Pruebas de antagonismo con *Trichoderma*

Con respecto a los ensayos con *Trichoderma*, se encontraron diferencias significativas (**ver Anexo**) en el crecimiento de las colonias del hongo patógeno *Penicillium*, en cultivo dual con *Trichoderma*, en comparación con el testigo (cultivo individual de *Penicillium*) (**Figura 35**). *Trichoderma* generó una disminución del diámetro final de las colonias del patógeno del 87 %.

El elevado porcentaje de disminución del tamaño de las colonias de *Penicillium*, observado en el presente trabajo, coincide con los numerosos estudios realizados acerca del efecto antagónico de cepas de *Trichoderma*; estudios que determinaron la efectividad de *Trichoderma* para inhibir y micoparasitar diferentes hongos filamentosos patógenos de plantas, a través de su actividad fisiológica y bioquímica (Quiroz Sarmiento *et al.*, 2008; Handelsman y Stabb, 1996; Harman *et al.*, 2004; Vinale

et al., 2006). Quiroz Sarmiento *et al.* (2008) utilizaron dos cepas de *Trichoderma* spp. (ST-2 y RP-12b) para evaluar su efecto antagónico sobre dos cepas de *Fusarium* spp. (SP-P4 y CH-A3) y *Penicillium* sp. (CH-A3). Los autores mencionados determinaron que la cepa de *Trichoderma* RP-12b causó el 100 % de inhibición del crecimiento de los tres patógenos. En ambos casos, las cepas de *Trichoderma* mostraron la tendencia hacia el micoparasitismo. Los daños observados fueron la lisis y destrucción de conidióforos y esporas de *Penicillium*; y la deformación de conidios y lisis de los septos en *Fusarium*. Quiroz Sarmiento *et al.* (2008) también mencionaron que “estos efectos sobre las estructuras de los patógenos pueden estar relacionados con la producción de enzimas tales como quitinasa, β -glucanasa, celulasa y proteasa por parte de las cepas de *Trichoderma*, y que son un componente importante en el proceso del micoparasitismo” (De la Cruz *et al.*, 1992; Goldman *et al.*, 1994; Harman, 2006).

Por su parte, Vinale *et al.* (2006) observaron en ensayos *in vitro* que *Trichoderma harzianum* raza T22 produce una azafilona (un metabolito secundario – policétido) con una marcada inhibición del crecimiento de patógenos como *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora ultimum*, resultando en una inhibición total del crecimiento de los mismos con una concentración de 1, 10 y 100 μg respectivamente.

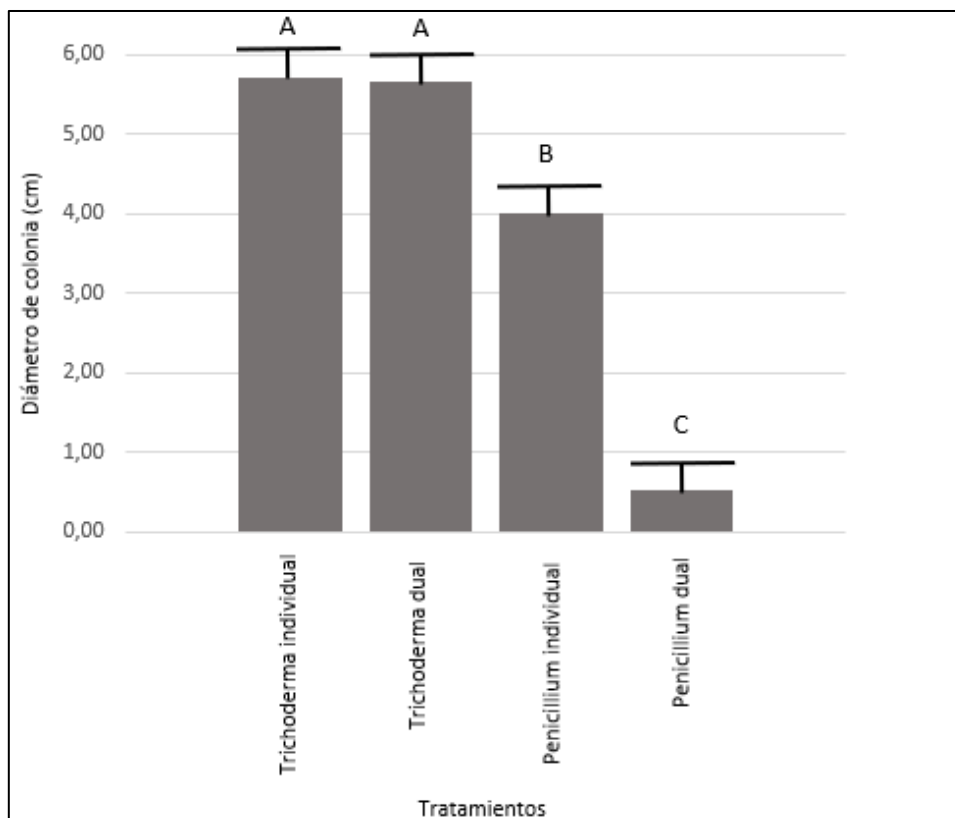


Figura 35. Diámetro de colonias de *Penicillium* y *Trichoderma* en cultivo individual y dual. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con un n muestral igual a 12. Las líneas por encima de las barras indican el error de la media.

En la **Figura 36** se observa como ya al segundo día de sembradas las placas, el crecimiento de las colonias del patógeno se ve inhibido en forma considerable. Esto se debe al antagonismo generado por el hongo *Trichoderma*.

En cuanto a la dinámica del crecimiento de las colonias de *Trichoderma*, en cultivo individual, ésta muestra una típica curva de saturación, mientras que en cultivo dual se observa un amesetamiento de la curva a partir del día dos de la prueba, este comportamiento se extiende hasta el día cuatro donde se observa una aceleración progresiva para finalmente alcanzar al séptimo día, el mismo diámetro de colonia que el cultivo individual testigo (**Figura 37**). No se observaron diferencias estadísticamente

significativas en el diámetro de colonias de *Trichoderma* en cultivo dual en comparación con el cultivo individual del mismo (**Figura 35**).

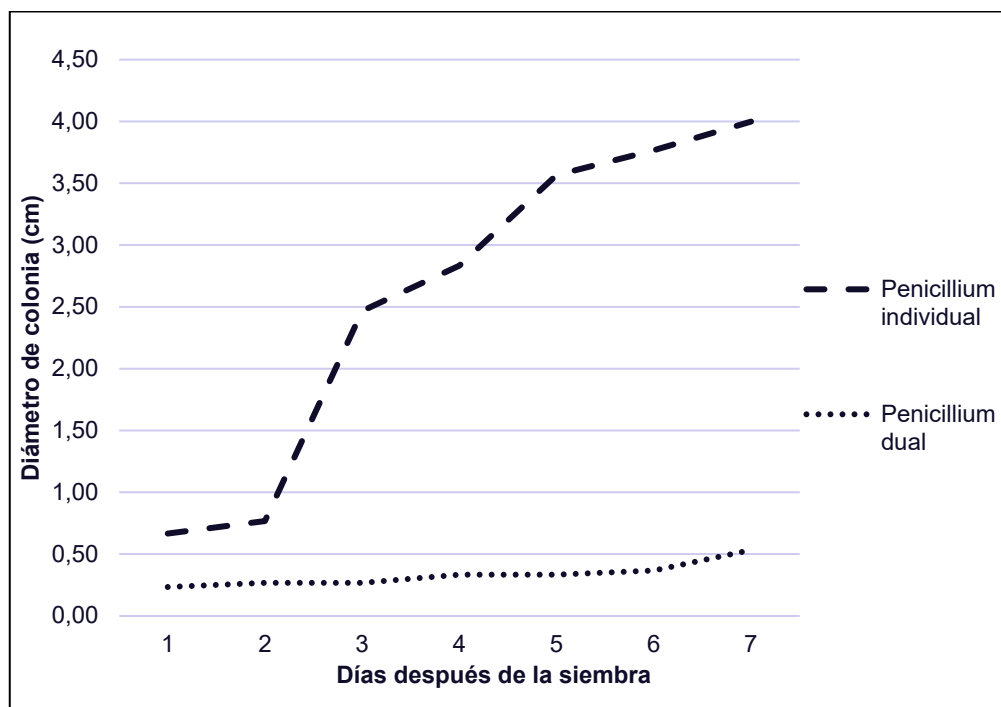


Figura 36. Diámetro de colonias de *Penicillium* sp. en cultivo dual con *Trichoderma* e individual (testigo).

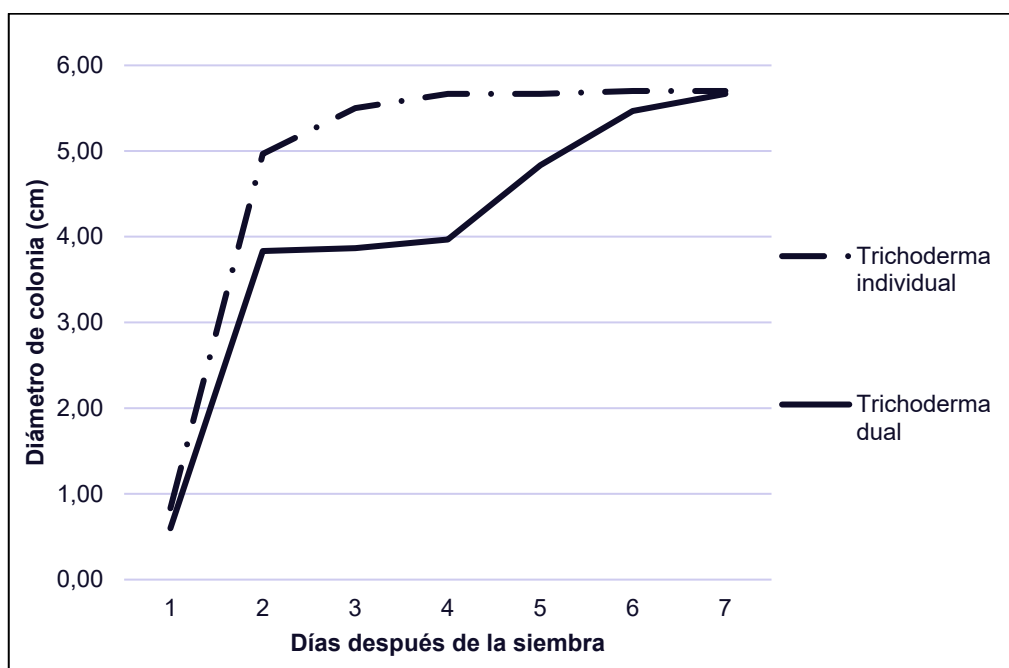


Figura 37. Diámetro de colonias de *Trichoderma* en cultivo dual con *Penicillium* sp. e individual (Testigo).

Los resultados alcanzados tanto con los extractos de ricino como con *Trichoderma* pusieron en evidencia el potencial efecto biocontrolador que dichos tratamientos poseen. Sin embargo, cabe destacar que el uso de *Trichoderma* alcanzó mejores resultados con respecto a la reducción de las colonias del patógeno en estudio. El uso de *Trichoderma* logró una reducción del tamaño del patógeno cercana al 87 %, mientras que el tratamiento Ricino III, aquel de mejor comportamiento, logró que las colonias del patógeno se desarrollen un 55 % menos con respecto al cultivo individual del mismo.

13. Conclusiones

La adición del aceite de ricino en el medio de cultivo de *Botrytis cinerea* resulta en un potencial estimulador del crecimiento de esclerocios del patógeno cualquiera sea su concentración. Se encontró que la concentración de mayor estímulo para el crecimiento de los esclerocios fue la de 350 ppm. Por consiguiente, se considera promisorio la utilización del aceite de ricino como complemento nutritivo de medios de cultivo de *B. cinerea*, no así como un biocontrolador de este hongo debido a los resultados ya expuestos.

El uso de *Trichoderma* en control biológico de patógenos fúngicos es una alternativa altamente efectiva al control químico, por ejemplo, como reemplazo del bromuro de metilo. Esto se demostró tanto en el presente trabajo frente al cultivo de *Penicillium*, como en otros anteriormente mencionados. Sin embargo, no resulta ser la única alternativa, sino que también los diferentes extractos de las semillas de ricino evaluados mostraron efectos positivos en el control de *Penicillium*. Esto resulta de

gran importancia debido al impacto ambiental y a la salud humana que representa la utilización de sustancias químicas tan perjudiciales como el bromuro de metilo.

De la hipótesis formulada originalmente:

El aceite de ricino tiene efecto antagónico sobre el crecimiento y desarrollo de esclerocios de *Botrytis cinerea* en pruebas *in vitro*, y extractos de ricino y aislamientos de *Trichoderma harzianum* tienen efecto antagónico sobre el crecimiento y desarrollo de *Penicillium* sp. en pruebas *in vitro*.

La hipótesis fue confirmada parcialmente en relación a:

Los extractos de ricino y los aislamientos de *Trichoderma* tienen efecto antagónico sobre el crecimiento y desarrollo de *Penicillium* sp. en pruebas *in vitro*.

En tanto, fue refutada en relación a que:

No se detectó efecto antagónico del aceite de ricino, por el contrario, su utilización estimuló la germinación, el desarrollo y la subsiguiente formación de esclerocios de *B. cinerea*.

Estos resultados promisorios resaltan la necesidad de continuar realizando investigaciones con extractos de ricino para lograr identificar y cuantificar las sustancias que componen dichos extractos, analizando principalmente el contenido proteico de los mismos, y además poder determinar la toxicidad que presentan frente a otros géneros fitopatógenos. Por otro lado, sería óptimo experimentar con protocolos de extracción alternativos para luego evaluar el efecto controlador de los diferentes extractos obtenidos.

Los resultados alcanzados permiten formular las siguientes hipótesis a probar en futuros estudios:

- El efecto de estimulación del crecimiento de *B. cinerea* causado por el aceite de ricino, y su consiguiente efecto nulo sobre el patógeno, podría deberse a la total eliminación de los compuestos tóxicos que estaban presentes en las semillas.

- La total eliminación de los compuestos tóxicos que estaban presentes en las semillas se debe al proceso industrial por el que se extrae el aceite de ricino, dado que la ricina es una proteína hidrosoluble y esta no se extrae juntamente con el aceite.

- El aceite de ricino podría ser utilizado como complemento nutritivo del medio de cultivo de *Botrytis* y otros hongos fitopatógenos.

- Extractos de ricino podrían utilizarse como tratamiento preventivo y/o curativo de enfermedades en plantas de frutillas.

14. Bibliografía

Abdul W. M., Hajrah N. H., Sabir J. S. M., Al-Garni S. M., Sabir M. J., Kabli S. A., Saini K. S., Bora R. S. (2018) Therapeutic role of *Ricinus communis* L. and its bioactive compounds in disease prevention and treatment. *Asian Pac J Trop Med* 11(3):177–185

Agrios, G.N. (2005) *Plant Pathology*. 5ta edición, Elsevier Academic Press, New York.

Arboleda F., Guzmán O., Mejía L. (2012). Efectos de extractos cetónicos de higuerilla (*Ricinus communis*) sobre el nematodo barrenador (*Radhopolus similis*). *Revista Luna Azul*, 35: 28-47.

Audi, J., Bolson, M., Patel, M., Schier, J., Osterloh, J. Ricin Poisoning: A Comprehensive Review. (2005). *JAMA* 294(18):2342–2351.

Backhouse, D., & Willetts, H. J. (1984). A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(2), 171-178.

Becerra, C., Robledo, P., Defilippi, B. (2013). Cosecha y poscosecha de frutilla. En Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). *Manual de frutilla*. Chillán, Chile: Undurraga, P. D. y Vargas, S. S.

Recuperado de: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39084.pdf>

Bradberry, S. M., Dickers, K. J., Rice, P., Griffiths, G. D., & Vale, J. A. (2003). Ricin poisoning. *Toxicological reviews*, 22(1), 65–70.

Bigi, M. F. MA, Torkomian, V. LV, de Groote, S. T. CS, Hebling, M. JB, Bueno, O. C, Pagnocca, F. C, Fernandes, J. B, Vieira, P. C, da Silva, M. F. GF (2004) Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. Pest Manag Sci 60:933–938

Caballero Mairesse, G. G., Soilán Duarte, L. C. (2018). Efecto del producto biológico a base de *Bacillus subtilis* sobre la antracnosis (*Colletotrichum fragariae brooks*) y la mancha marrón (*Pestalotiopsis sp.*) en los plantines de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch). XXVI Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM. Mendoza, Argentina. Recuperado de: https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/12843/20-productos-naturales-bioactivos-caballero-gabriela-una.pdf

CADEA. Cámara Argentina del Aerosol (2017). 30 años del Protocolo de Montreal. Recuperado de: <https://www.cadea.org.ar/30-anos-del-protocolo-de-montreal/>

Caffarini, P., Pelicano, A., Carrizo, P., Roggero, P., Pacheco, J., (2008). Efectos de extractos cetónicos y acuosos de *Ricinus communis* (ricino), *Melia azedarach* (paraíso) y *Trichillia glauca* (trichillia), sobre la hormiga negra común (*Acromyrmex lundí*). Idesia (Arica), 26(1): 59-64

Caminiti A. (2015). Cultivo de frutillas en la provincia del Neuquén. INTA. EEA San Carlos de Bariloche.

Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Salta: Universidad Nacional de Salta. 118 pp.

Castañeda Lopez y Contreras Montejo (s.f.). Diseño del proceso de extracción de aceite de higuerrilla en La Palma (Cundinamarca). Proyecto de Grado. Universidad EAFIT

CCB. Cámara de Comercio de Bogotá. (2015). Manual: Fresa. Programa de apoyo agrícola y agroindustria. En: Castañeda López, K. J., Contreras Montejo, T. L. (s.f.). Diseño del proceso de extracción de aceite de higuerrilla en La Palma (Cundinamarca). Proyecto de grado. Universidad EAFIT. Medellín, Colombia.

CEPAL. Comisión Económica de América Latina y el Caribe. (s.f.) Convenio de Viena para la Protección de la Capa de Ozono. Observatorio del Principio 10. Recuperado de: <https://observatoriop10.cepal.org/es/tratados/convenio-viena-la-proteccion-la-cap-a-ozono>

Chaves, N., Wang, A. (2004). Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. Revista Agronomía Costarricense 28(2): 73-85.

Colavino, M., Pelicano A., Giménez, R., (2006). Actividad insecticida de *Ricinus communis* sobre *Plodia interpunctella* HBN. (Lepidoptera: Phycitinae). Rev. FCA UNCuyo, XXXVIII (1): 13-18

Correa Salgado, M. (2014). Análisis comparativo de características físicas y fitoquímicas del aceite de ricino generado en semillas de ecotipos autóctonos de higuerrilla (*Ricinus communis*), Tungurahua y Manabí (Trabajo de titulación). Universidad Técnica de Ambato.

Cote Daza, S. P. (2011). Efecto de la intensidad de la radiación UV-C sobre la calidad sensorial, microbiológica y nutricional de frutos. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Buenos Aires.

Davis W. H., (1968). Castor meal as a protein supplement for fattening beef cattle. (Thesis Master of Science). Graduate Faculty of Texas Technological College, United States.

De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J M., Benitez, T., Pintor-Toro, J. A., Llobell, A. (1992) Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. Eur. J. Biochem. 206, 859-867

De La Fuente, E. B., Gil, A., Kantolic, A. G., Pereira, M. L., Ploschuk, E. L., Giménez, P. I., Windaer, L.B., (2013). Cultivos Industriales (3a ed.). Buenos Aires: Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Dhingra, O. D. (1986). Basic Plant Pathology Methods Washington: CRC Press, Inc.

Di Rienzo, J.A., Casanaves, F., Balzarini, M., González, L., Tablada, M., Robledo. C.W. (2014). InfoStat Versión 2014. Facultad de Ciencias Agropecuarias: Universidad Nacional de Córdoba.

Droby, S., Wisniewski, M., El-, A., Wilson, C. (2003). Biological control of postharvest disease of fruit and vegetables. Current's achievements and future challenges. En: XXVI International Horticultural Congress: Issues and Advances in Postharvest Horticulture. pp. 703-713.

Droby, A. y Lichter, A. (2004) Post-harvest Botrytis infection: etiology, development and management. En: Botrytis: Biology, Pathology and Control. (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds), pp. 349–367. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.

Engelbrecht, R.W. (2002) The role of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitís capitata*, in *Botrytis* bunch rot on grape. MSc thesis, University of Stellenbosch, South Africa.

EPA. United States Environmental Protection Agency. Methyl Bromide. Recuperado de: <https://www.epa.gov/ods-phaseout/methyl-bromide>

Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC). (2018). Reporte agroindustrial: actividad comercial del cultivo de frutilla en la Argentina y Tucumán, período 2010-2017. Recuperado de:

<http://www.eeaoc.org.ar/upload/publicaciones/archivos/821/20180814152010000000.pdf>

Ezziymani, M., Pérez Sánchez, C., Sid Ahmed, A., Requena, M. E., Candela M. E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). Anales de Biología (26) 35-45.

Fakhrunnisa, H., Ghaffar, A. (2006). In vitro interaction of *Fusarium spp.*, with other fungi. Pakistan Journal of Botany. 38: 1317-1322.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (1998). Informe: Reunión regional sobre alternativas para la sustitución

del uso de bromuro de metilo en la agricultura. Caracas, Venezuela. Recuperado de: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Methyl_Bromide/bromre
po.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Methyl_Bromide/bromre
po.pdf)

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (1986). Definiciones para los fines del Codex Alimentarius.

Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/W5975S/w5975s08.htm>

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta. Recuperado de: <http://www.fao.org/news/story/es/item/1141818/icode/>

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2020). World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2020. Rome, pp. 130 y 140. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/cb1329en/CB1329EN.pdf>.

FAUBA. Herbario virtual. Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Buenos Aires (s.f.). Moho gris de la frutilla (*Botrytis cinerea*). Recuperado de: http://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page_id=835

Feldberg, L., Schuster, O., Elhanany, E., Laskar, O., Yitzhaki, S., Gura, S. (s.f.). Rapid and Sensitive Identification of Ricin in Environmental Samples Based on Lactamyl Agarose Beads Using LC-MS/MS(MRM). Israel Institute for Biological Research, Ness Ziona, Israel.

Fermaud, M. and Gaunt, R.E. (1995) *Thrips obscuratus* as a potential vector of *Botrytis cinerea* in kiwifruit. Mycol. Res. 99, 267–273.

Ferraud, M. and Le Menn, R. (1989) Association of *Botrytis cinerea* with grape berry moth larvae. *Phytopathology*, 79, 651–656.

Fernandes, K.V., Deus-de-Oliveira, N., Godoy, M.G., Guimarães, Z.A.S., Nascimento, V.V., Melo, E.J.T. de, Freire, D.M.G., Dansa-Petretski, M., & Machado, O.L.T. (2012). Simultaneous allergen inactivation and detoxification of castor bean cake by treatment with calcium compounds. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(11), 1002-1010.

Fraire Cordero, M. L., Yáñez Morales, M. J., Nieto, A. D., Vázquez Gálvez, G. (2003). Hongos patógenos en frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 285-291.

Franke, H., Scholl, R., Aigner, A. (2019). Ricin and *Ricinus communis* in pharmacology and toxicology-from ancient use and “Papyrus Ebers” to modern perspectives and “poisonous plant of the year 2018”. *Naunyn - Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology* 392:1181 – 1208.

Gandhi, V.M., Chrian, K.M., Mulky, M.J. (1994). Destoxification of castor seed meal by interaction with sal seed meal. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 71, 827–831.

Gilardino, M. S., Sandoval, M. C., Salvarezza, A., Tagliatalata, D., Casacchia Sassone, L., Fernández, M. V., Piwowarczuk, C. E., Rafart, E., Ruiz, C.S., (2018). Patógenos fúngicos de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivada bajo sistema de transición ecológica. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental*. 5(3): 3-12

Goldman, H.G., Hayes, C., Harman, G.E. (1994) Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends in Biotechnology* 12:478–482

Gomes Raffagnato, C., Abadalla de Oliveira Cardoso, T., Vasconcelos Fontes, F., Montez Carpes, M., Cynamon Cohen, S., Americo Calçada, L. (2019). Chemical terrorism: risk modeling proposal for attacks involving ricin in mass gatherings in Brazil. *Saúde debate*, 43(3): 152-164.

González, B. A. (2017). Enfermedades de cultivos hortícolas: frutilla. Universidad Nacional de Luján. Patología Vegetal. UNLu. Recuperado de: <http://www.patologiavegetal.unlu.edu.ar/?q=node/69>

Guamán Salán, J. C. (2017). Evaluación de *Trichoderma harzianum* Rafai y dos extractos vegetales en mora, fresa y tomate en post-cosecha, contra *Botrytis* sp., *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp. (Trabajo de maestría). Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cuenca, Ecuador.

Guédez, C., Cañizález, L., Castillo, C. y Olivar, R. (2009). Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; 29:34-38

Hamelin, E. I., Johnson, R. C., Osterloh, J. D., Howard, D. J., Thomas, J. D. (2012). Evaluation of Ricinine, a Ricin Biomarker, from a Non-Lethal Castor Bean Ingestion. *Journal of Analytical Toxicology* 2012; 36:660–662.

Handelsman, J., Stabb, E. V., (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* 8: 1855-1869

Harman, G.E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190–194

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56

Hurrell, J. A., Bazzano, D. H., Delucchi, G. (2004). *Biota Rioplatense IX: arbustos 2 Nativos y exóticos*. Buenos Aires: Literature of LatinAmerica (L.O.L.A.).

IQB. Instituto Químico Biológico (2011). Ricina. Recuperado de: <https://www.iqb.es/monografia/toxinas/ricina.htm#estructura>

Keller, H. A., Pirono, A., Stampella, P. (2018). El cultivo del ricino y el ambay en comunidades guaraníes del nordeste argentino, aproximación etnobotánica de su historia y cosmología. *Bonplandia* 27 (1): 23-30.

Kirschbaum, D.S., Alderete, G.L., Rivadeneira, M., Borquez, A.M., Mollinedo, V.A., Funes, C.F., Meneguzzi N.G. (s.f.). Reconocimiento de plagas frecuentes, organismos benéficos y enfermedades habituales del cultivo de frutilla en el Noroeste Argentino. Argentina. Ministerio de Producción. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Lacey, J. (2002). Pre AND post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology*, 11-25.

Latorre, B. A., Agosin, E., San Martín, R., Vásquez, G. S. (1997). Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot table grape in Chile. *Crop Protection*. 16: 209-14.

Latorre, B. A. y Rioja, M. E. (2002). Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de comidas de *Botrytis cinerea*. *Ciencia e Investigación Agraria: Rev. Latinoamericana de Ciencias de la Agricultura*, 29 (2): 66_72.

Lord, M. J., Jolliffe, N. A., Marsden, C. J., Pateman, C. S., Smith, D. C., Spooner, R. A., Watson, P. D., & Roberts, L. M. (2003). Ricin. Mechanisms of cytotoxicity. *Toxicological reviews*, 22(1), 53–64.

Louis, C., Girard, M., Kuhl, G. and Lopez-Ferber, M. (1996) Persistence of *Botrytis cinerea* in its vector *Drosophila melanogaster*. *Phytopathology*, 86, 934–939.

Louws, F. (2014). Botrytis Fruit Rot / Gray Mold on Strawberry. N.C. Cooperative Extension. Recuperado de:

https://content.ces.ncsu.edu/botrytis-cinerea-botrytis-fruit-rot-and-blight-on-strawberry#section_heading_2925

Magnasco, E.; Di Paola, M. M. (2015). “Agroquímicos en argentina ¿Dónde estamos? ¿A dónde vamos?”. (pp.147-164). En: Di Pangraccio, A.; Nápoli, A.; Sangalli F. (Eds.) Informe Ambiental Anual 2015. - 1a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Fundación Ambiente y Recursos Naturales. 416 p.

MAGyP. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2019). Cadena de frutillas: Resumen. Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas. Dirección de Cadenas Alimentarias (DCA). Argentina.

Mangione, J. L. (2013). Manejo y enfermedades postcosecha de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.). Laboratorio de Sanidad Vegetal. Cooperativa del Mercado Central de Buenos Aires.

Merck (2021). Lectin from *Ricinus communis* (castor bean) Agglutinin RCA120.
Recuperado de: <https://www.sigmaaldrich.com/AR/es/product/sigma/l7886>

McNicol, R.J., Williamson, B. and Dolan, A. (1985) Infection of red raspberry styles and carpels by *Botrytis cinerea* and its possible role in post-harvest grey mould. *Ann. Appl. Biol.* 106, 49–53.

Ministerio de Justicia y Derechos Humanos. Ley N° 23.778. Argentina.
Recuperado de:
<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/0-4999/179/norma.htm>

Miserendino, E. (s.f.). Frutillas Implantación del cultivo en Patagonia. Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle entro Regional Patagonia Norte. Publicaciones Regionales. Ediciones INTA

Murillo, B. G., Guerrero, E. E. F., Zapata, S. R. (2016). Manejo ecológico en frutilla aplicando *Trichoderma* sp como promotor de crecimiento y controlador biológico de *Botrytis cinerea*. *Avances en energías renovables y medio ambiente*. 20: 09.37-09.44.

Murray, R., Candan, A. P., Vázquez, D. (eds.) (2019). Manual de poscosecha de frutas: manejo integrado de patógenos. 2da edición revisada. Buenos Aires: INTA ediciones

National Center for Biotechnology Information (2019). *Botrytis*. Taxonomy Browser. Recuperado de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=33196&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>

National Center for Biotechnology Information (2021). *Penicillium*. Taxonomy Browser. Recuperado de:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5073>

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 10666, Ricinine. Recuperado de:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ricinine>.

National Center for Biotechnology Information (2021). *Trichoderma*. Taxonomy Browser. Recuperado de:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5543>

Lows, F. (2014). *Botrytis* Fruit Rot / Gray Mold on Strawberry. NC State Extension Publications. Recuperado de: <https://content.ces.ncsu.edu/botrytis-cinerea-botrytis-fruit-rot-and-blight-on-strawberry>

Nicholson, G.L., Claustein, J. (1972) The interactions of *Ricinus communis* agglutinin with normal and tumour cell surfaces. *Biochimica Biophysica Acta*, 266, 543–547.

O’Neil, M.J., Smith, A., Heckelmen, P.E., Budavari, X. (2001) *The Merck Index*. 13th edition. Merck & Co., Whitehouse Station, NJ.

ONU. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial y Ministerio del Medio Ambiente de Chile (2015). Cultivo de frutilla, en una realidad sin bromuro de metilo en Chile. Proyecto Terminal Eliminación Nacional del Bromuro de Metilo

Ortiz-Rivera, Y., Hernández-Carillo J. G., Orta-Zavalza, E., González-Rodríguez S. E. (s.f.). Evaluación del efecto anitimicrobiano de la reuterina en cubiertas comestibles en fresas. Reporte técnico. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

Pacheco, R. M., Barbona, E. I. (2017). Manual de uso seguro y responsable de agroquímicos en cultivos frutihortícolas. INTA Ediciones.

Pacheco Sánchez, C., Villa Ayala, P., Montes-Belmont, R., Figueroa-Brito, R., Jiménez-Pérez, A., (2009). Repellency of hidroethanolic extracts of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). I. J. Appl. Sci. Techh.,2:83-94.

Pina, J. I. (2012). Clasificación Toxicológica y Etiquetado de Productos Fitosanitarios. Criterios Regulatorios Locales e Internacionales. ILSI Argentina. Serie de Informes Especiales.

Pita, R., Anandón, A., Martínez-Larrañaga, M. R. (2004). Ricina: una fitotoxina potencial de uso potencial como arma. Rev. Toxicol. 21: 51-63.

Pitt J. I., Leistner L. (1991). Toxigenic *Penicillium* species. pp. 81-99 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. Boca Ratón: CRC Press.

Pórfido, O. D. (2014). Los plaguicidas en la República Argentina. 1a ed. - Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación.

Quiroz-Sarmiento, V. F., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Lara Hernández, M. E. (2008). Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. Revista mexicana de Micología, 26: 27-34.

Ramos Jaramillo, E. G. (2014) Obtención de un insecticida biológico a partir de la higuera (*Ricinus communis*) (Trabajo de titulación). Universidad técnica de Machala.

Revol Alurralde, I. Estudio del bromuro de metilo en el cultivo de tabaco. Universidad Nacional de Salta. Facultad de Ciencias Agrarias. (s.f.). Recuperado de: <http://www.ingenieroambiental.com/new3informes/tabaco.htm>

Rodríguez Arias, D. E., Duque Nieto, J. S. (2010). Plan de negocios para el cultivo de higuera, estudio de caso municipio de Balboa (Risaralda). Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Ciencias Ambientales.

Ruiz, C. S. (2017). Enfermedades de poscosecha en frutilla (*Fragaria x ananassa* Duchesne). Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ. Vol. 4(3): 41-45.

Rupp, S.; Plesken, C., Rumsey, S., Dowling, M., Schnabel, G., Weber, R.W.S.&Hahn, M. (2017). *Botrytis fragariae*, a New Species Causing Gray Mold on Strawberries, Shows High Frequencies of Specific and Efflux-Based Fungicide Resistance. *Appl Environ Microbiol* 83:e00269-17. [Madison, Estados Unidos]: Daniel Cullen, USDA Forest Products Laboratory. Recuperado de: <https://aem.asm.org/content/aem/83/9/e00269-17.full.pdf>

Sandoval, M. C., Belesansky, C. I. (2020). Producción artesanal del hongo antagónico *Trichoderma* Persoon en sustrato sólido. Nota técnica. Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ. Vol. 7 (3) 2020: 55-64.

Sayegh Ordoñez, A. N, Cárdenas Arias, L. G. (2011). Plan de empresa basado en el uso de aceite de higuera para la industria cosmética. Tesis de Maestría, Universidad ICESI

Schieltz, D. M., McGrath, S. C., McWilliams, L. G., Rees, J., Bowen, M. D., Kools, J. J., Dauphin, L. A., Gomez-Saladín, E., Newton, B. N., Stang, H. L., Vick, M J., Thomas, J., Pirkle, J. L., Barr, J. R, (2010). Analysis of active ricin and castor bean proteins in a ricin preparation, castor bean extract, and surface swabs from a public health investigation. *Forensic Science International* 209 (201 1) 70-79.

SENASA. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2006). Resolución-77-2006

SENASA. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2012). Resolución-302-2012.

Severino, L. S., D. L. Auld, M. Baldanzi, M. J. Cândido, G. Chen, W. Crosby, D. Tan, X. He, P. Lankshamma, C. Lavanya, O. L. T. Machado, T. Mielke, M. Milani, T. D. Miller, J. B. Morris, S. A. Morse, A. A. Navas, D. J. Soares, V. Sofiati, M. L. Wang, M. D. Zanotto & H. Zieler (2012). A review on the challenges for increased production of castor. *Agronomy Journal* 104(4): 853-880.

SINAVIMO (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas). (s.f.). *Rhizopus stolonifer*. Recuperado de:

<https://www.sinavimo.gov.ar/plaga/rhizopus-stolonifer>

SINAVIMO (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas). (s.f.). *Ricinus communis*. Recuperado de: <https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/ricinus-communis>

Sivakumar, D., Bautista Baños, S. (2014). A review of the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruits quality during storage. *Crop Protection*: 64-27

Soto, S. (2017). Pudrición gris- Moho gris del tomate. Ficha Técnica N° 40. Sanidad Vegetal INIA. Recuperado de:

<http://www.inia.cl/wpcontent/uploads/FichasTecnicasSanidadVegetal/Ficha%2040%20Pudricion%20gris%20-%20Moho%20gris%20en%20tomate.pdf>

Tabio García, D., Díaz Domínguez, Y., Rondón Macías, M., Fernández Santana, E., Piloto-Rodríguez, R. (2017). Extracción de aceites de origen vegetal. Universidad Tecnológica de La Habana.

Tripathi, P.; Shulka, A.K. (2007). Emerging non-conventional technologies for control of post harvest diseases of perishables. *Fresh Produce*, 1:111-120.

Undurraga, P y Vargas S. (eds.). (2013). Manual de frutilla. Boletín INIA N° 262. 112 p.

US 3060165. Craig, H. L., Alderks, O. H., Corwin, A. H., Diecke, S. H., Karel, C. L., (1962). United States Patent Office. Preparation of toxin ricin. Ser. No. 297142. Secretary of Army. EEUU.

US 4398937. Van Aller, R. T., Pessoney, G. F. (1983). United States Patent. Selective algaecides for control of Cyanochloronta. Appl. No.: 308987.

Vandita, P., Amin, N., Khyati, P., Monisha, K. (2013). Effect of phytochemical constituents of *Ricinus communis*, *Pterocarpus santalinus*, *Terminalia belerica* on antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. Int J Toxicol Pharmacol Res 2013; 5(2): 47-54.

Vignolo, R., Naughton, F. (1991) Castor: A new sense of direction. Inform, 2, 692–699.

Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito M., Sivasithamparam. K., (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Letters in Applied Microbiology 43: 143-148.

Vitetta, E.S., Krolick, K.A., Miyama-Inaga, M., Cushley, W., Uhr, J.W. (1983) Immunotoxins: A new approach to cancer therapy. Science, 219, 644–650.

Wang, Y., Yu, G., Han, Z., Yang, B., Hu, Y., Zhao, X., Wu, J., Lv, Y., Chai, W. (2011). Specificities of *Ricinus communis* agglutinin 120 interaction with sulfated galactose. FEBS Letters, Volume 585, Issue 24, Pages 3927-3934, ISSN 0014-579.

Williamson BB, Tudzynski P, Tudzynski JAL, Vankan (2007) *Botrytis cinerea* the cause of grey mold disease. Molecular Plant Pathology 8: 561-580.

Worbs, S., Kohler K., Pauly, D., Avondet, M., Schaer, M., Dorner, M., Dorner, B. (2011). *Ricinus communis* Intoxications in Human and Veterinary Medicine – A Summary of real cases. Toxins. 1332-1372.

Yang, K. S., Triplett, R., Klos, K. S., Waller, G. R. (1965). Chemical Synthesis of Carbon-14 Labeled Ricinine and Biosynthesis of Ricinine in *Ricinus communis* L. Oklahoma State University, Agricultural Experiment Station.

15. Anexos

Nueva tabla : 14/2/2021 - 16:48:52 - [Versión : 30/4/2020]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diámetro de colonias (cm)	12	0,87	0,82	18,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15,98	3	5,33	17,27	0,0007
Tratamiento	15,98	3	5,33	17,27	0,0007
Error	2,47	8	0,31		
Total	18,44	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,45189
 Error: 0,3083 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Penicillium	5,07	3	0,32	A
C	2,53	3	0,32	B
A	2,43	3	0,32	B
B	2,27	3	0,32	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 38. Análisis estadístico según programa Infostat para prueba con extractos de ricino. Referencias: A (Ricino I), B (Ricino III), C (Ricino II), *Penicillium* (Testigo).

Nueva tabla_1 : 14/2/2021 - 16:53:21 - [Versión : 30/4/2020]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diámetro de colonias (cm)	12	0,96	0,94	13,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	53,05	3	17,68	58,62	<0,0001
Tratamiento	53,05	3	17,68	58,62	<0,0001
Error	2,41	8	0,30		
Total	55,46	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,43611
 Error: 0,3017 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Trichoderma individual	5,70	3	0,32	A
Trichoderma dual	5,67	3	0,32	A
Penicillium individual	4,00	3	0,32	B
Penicillium dual	0,53	3	0,32	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 39. Análisis estadístico según programa Infostat para prueba con *Trichoderma*.