# UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales Instituto de Agroindustria



"EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA ESPECIE *QUILLAJA SAPONARIA* MOL. CULTIVADA *IN VITRO* EN *BOTRYTIS CINEREA* PERS."

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

**ALEJANDRA ENGRACIA RIBERA FONSECA** 

TEMUCO – CHILE 2007

# UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales Instituto de Agroindustria



"EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA ESPECIE *QUILLAJA SAPONARIA* MOL. CULTIVADA *IN VITRO* EN *BOTRYTIS CINEREA* PERS."

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

**ALEJANDRA ENGRACIA RIBERA FONSECA** 

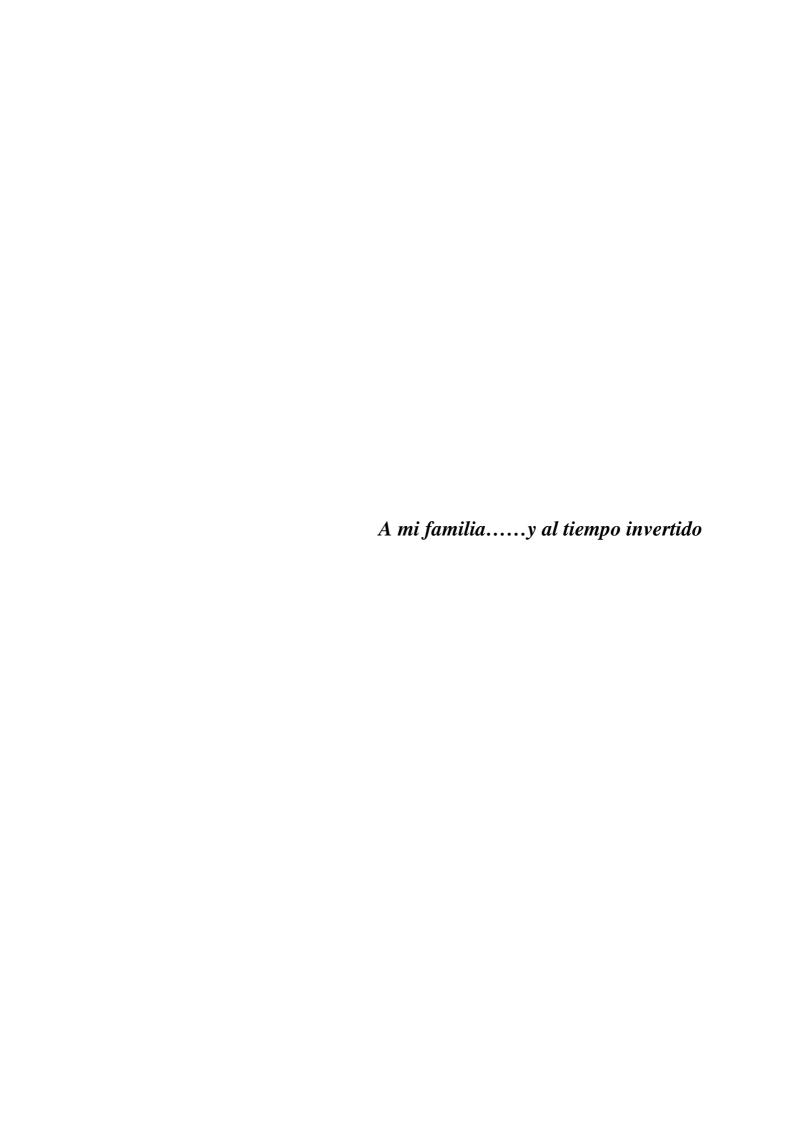
TEMUCO – CHILE 2007

# "EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA ESPECIE QUILLAJA SAPONARIA MOL. CULTIVADA IN VITRO EN BOTRYTIS CINEREA PERS."

Esta Tesis fue realizada bajo la supervisión del Dr. GUSTAVO ZUÑIGA NAVARRO, de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile, como tutor externo; y del Dr. ANDRÉS QUIROZ CORTÉZ, del Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad de La Frontera, como tutor interno; y ha sido aprobada por los miembros de la comisión examinadora.

## ALEJANDRA ENGRACIA RIBERA FONSECA

DIRECTOR PROGRAMA DE POSTGRADO EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES	Dr. GUSTAVO ZÚÑIGA N.
	Dr. ANDRES QUIROZ C.
DIRECCIÓN DE POSTGRADO UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA	Dra. ANA GUTIERREZ M.
	Dra. CAROLINA SHENE D.
	Dr. ALEJANDRO URZÚA M.
	 Dr. GASTON MUÑOZ V.



#### **AGRADECIMIENTOS**

A Dios....

A mi familia, por su confianza y apoyo incondicional, y a mis amigos cercanos, por su paciencia, comprensión y compañía.

Quisiera agradecer en forma especial a mi tutor de tesis, Dr. Gustavo Zúñiga N. (Universidad de Santiago de Chile), por haber contribuido en forma significativa en mi formación profesional y científica, por creer en mí, por darme ánimo en mis momentos más difíciles, por su amistad. Gracias por todo profe, de todo corazón.

A la Dra. Milena Cotoras (Universidad de Santiago de Chile), ya que su aporte fue fundamental para el desarrollo de este trabajo, por su disposición para atender, comprender y resolver las dudas que surgieron en el camino, por sus consejos. A la Dra. Leonora Mendoza (Universidad de Santiago de Chile), el Dr. Isidro G. Collado y la Dra. Rosa Durán Patrón (Universidad de Cádiz - España), por su colaboración y ayuda.

Al cuerpo docente del Programa de Postgrado en Ciencias de Recursos Naturales, el cual me entregó las herramientas necesarias para mi formación como Doctor, y a la Directora del Programa, Dr. María de Luz Mora G., por haber confiado en mis capacidades como estudiante y profesional, por su apoyo y preocupación. A la Srta. Lorena Leal, por su paciencia.

A mis compañeros de Laboratorio, en especial a Marcela Vivanco, Sandra Herrera, Marcelo Ortega, Carolina Sepúlveda y Mauricio Lozano, por su colaboración y ayuda en alguna de las etapas del desarrollo de esta investigación. Por su amistad.

A la Universidad de La Frontera por las becas de arancel y mantención durante los años de mi formación en el Programa, al Proyecto FIA-BIOT 01-A-22 por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación y al Proyecto MECESUP FRO0309 por los recursos económicos que hicieron posible la realización de mi pasantía de investigación durante el año 2006 en la Universidad de Cádiz-España.

# ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes Generales	1
1.2 Hipótesis de Trabajo	4
1.3 Objetivo General	4
1.4 Objetivos Específicos	4
2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	5
2.1 Botrytis cinerea Pers., agente causal de la pudrición gris	5
2.1.1 Etimología y clasificación taxonómica	5
2.1.2 Morfología y proceso de infección	6
2.1.3 Ciclo de vida	8
2.1.4 Síntomas, signos y rango de hospederos	9
2.1.5 Métodos de control fitosanitario	10
2.2 Metabolitos secundarios de plantas con propiedades antifúngicas	13
2.2.1 Fitoanticipinas antifúngicas	14
2.2.2 Fitoalexinas antifúngicas	20
2.2.3 Mecanismo de acción de fitoanticipinas y fitoalexinas antifúngicas	25
2.2.4 Actividad antifúngica de metabolitos secundarios de plantas en B. cinerea	27
2.3 Antecedentes de Quillaja saponaria Molina	30
2.3.1 Etimología y clasificación taxonómica	30
2.3.2 Descripción botánica	30
2.3.2 Distribución geográfica y hábitat	31
2.3.4 Caracterización química	32
2.3.5 Propiedades, usos e importancia económica	33
2.3.6 Estado de conservación	36
2.4 Cultivo in vitro de especies vegetales	37
2.4.1 Definición	37
2.4.2 Condiciones de cultivo	38

	2.4.3 Tipos de cultivo	40
	2.4.4 Aplicaciones	42
3	MATERIALES Y MÉTODOS	43
	3.1 Cultivo y propagación <i>in vitro</i> del material vegetal	43
	3.2 Inóculos y condiciones de cultivo de <i>B. cinerea</i>	44
	3.2.1 Medios de cultivo	44
	3.2.2 Obtención de inóculos	45
	3.3 Preparación de extractos vegetales	46
	3.4 Actividad antifúngica in vitro en B. cinerea de extractos de de quillay in vitro	46
	3.4.1 Crecimiento micelial <i>in vitro</i>	46
	3.4.2 Germinación de conidias	47
	3.4.3 Determinación de la dosis efectiva media (DE <sub>50</sub> )	48
	3.4.4 Actividad antifúngica de extractos de quillay in vitro & quillay in vivo.	48
	3.5 Actividad antifúngica in vivo en B. cinerea de extractos de quillay in vitro	48
	3.5.1 Habilidad de B. cinerea de colonizar hojas de tomate	49
	3.5.2 Desarrollo de infección por B. cinerea en frutos de frutilla	49
	3.6 Mecanismo de acción del extracto etanólico de quillay in vitro	50
	3.6.1 Consumo de oxígeno en conidias	50
	3.6.1.1 Obtención de la suspensión conidial	50
	3.6.1.2 Determinación del consumo de oxígeno	50
	3.6.2 Integridad de la membrana citoplasmática	51
	3.6.2.1 Captación del colorante fluorogénico Sytox Green	51
	3.6.2.2 Concentración de Fósforo y Potasio en el medio de incubación	51
	3.6.3 Grado de estrés oxidativo	52
	3.6.3.1 Lipoperoxidación de membranas	52
	3.6.3.2 Contenido de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	53
	3.6.3.3 Actividad de enzimas antioxidantes	53
	3.6.4 Producción y actividad in vitro de enzimas involucradas en la patogénesis	54
	3.6.4.1 Cutinasa (p-nitrofenil butirato esterasa)	55
	3.6.4.2 Poligalacturonasa	56

3.6.4.3 Lacasa	56
3.7 Fraccionamiento del extracto etanólico de brotes in vitro de quillay	56
3.7.1 Obtención de fracciones	56
3.7.2 Actividad antifúngica in vitro de las fracciones	57
3.8 Identificación de constituyentes antifúngicos en el extracto activo	57
3.8.1 Detección de metabolitos del tipo saponina	57
3.8.2 Detección de compuestos fenólicos	57
3.9 Análisis estadístico de datos	58
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1 Cultivo y propagación in vitro de quillay	59
4.2 Actividad antifúngica in vitro en B. cinerea de extractos de quillay in vitro	60
4.2.1 Efecto de los extractos en el crecimiento micelial in vitro	60
4.2.2 Efecto del extracto etanólico en la germinación de conidias	64
4.2.3 Dosis efectiva media del extracto etanólico	66
4.2.4 Actividad fungitóxica de extractos de quillay in vitro & quillay in vivo	68
4.3 Actividad antifúngica in vivo en B. cinerea de extractos de quillay in vitro	71
4.4 Mecanismos de acción del extracto etanólico de brotes in vitro de quillay	74
4.4.1 Consumo de oxígeno en conidias	74
4.4.2 Integridad de la membrana plasmática	78
4.4.3 Grado de estrés oxidativo	81
4.4.3.1 Contenido de peróxido de hidrógeno	82
4.4.3.2 Lipoperoxidación de membranas	84
4.4.3.3 Actividad de enzimas antioxidantes	86
4.4.4 Producción y actividad in vitro de enzimas involucradas en la patogénesis	89
4.4.4.1 Cutinasa (p-nitrofenil butirato esterasa)	90
4.4.4.2 Poligalacturonasa	93
4.4.4.3 Lacasa	96
4.5 Fraccionamiento del extracto etanólico de brotes in vitro de quillay	101
4.5.1 Rendimiento de las fracciones obtenidas	101
4.5.2 Actividad antifúngica in vitro de las fracciones en B. cinerea	101

4.6 Compuestos antifúngicos en extractos de brotes in vitro de quillay	102
4.6.1 Contenido de saponinas en los extractos y fracciones activas	102
4.6.2 Contenido de compuestos fenólicos en el extracto etanólico	109
5 CONCLUSIONES	111
6 PROYECCIONES DEL ESTUDIO	113
7 REFERENCIAS	114

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Morfología de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. A) Conidióforos, B) Conidias y C) Conidias en germinación.	6
2	Ciclo de vida de <i>Botrytis cinerea</i> Pers.	8
3	Sintomatología y signos del ataque por <i>Botrytis cinerea</i> en algunas especies vegetales de importancia agrícola. A) Frutilla, B) Uvas, C) Frambueso y D) Tomate.	9
4	Estructura de algunas fitoanticipinas con actividad antifúngica.	19
5	Estructura de algunas fitoalexinas con actividad antifúngica.	24
6	Quillaja saponaria Mol. A) Árbol adulto, B) Follaje, C) Flores y D) Frutos.	31
7	Estructura básica de las saponinas de Quillaja saponaria Mol.	33
8	Ejemplos de explantes vegetales cultivados in vitro.	37
9	Cámaras de crecimiento utilizadas para la incubación de plantas cultivadas <i>in vitro</i> .	39
10	Tipos de cultivos <i>in vitro</i> .	41

- Aislado U29 de *B. cinerea*. (A) Micelio en tubos inclinados, (B) Esporas en glicerol, (C) Cultivos esporulados de 10-15 días de incubación y (D) Micelio en crecimiento activo (72 horas de incubación).
- Etapas de la micropropagación de brotes *in vitro* de quillay. (A) 59 Explantes de micropropagación, (D) Multiplicación de explantes, (C) Brotes de 1 mes de incubación y (D) Plantas de quillay *in vitro* establecidas en invernadero.
- Efecto de extractos acuosos y etanólicos de brotes *in vitro* de quillay, 60 obtenidos mediante diferentes técnicas de extracción, en el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* Pers.
- Efecto de extractos acuosos de brotes *in vitro* de quillay en el crecimiento 62 micelial *in vitro* de *B. cinerea* Pers. (A) Cinética de crecimiento diaria;
  (B) Porcentage de inhibición del crecimiento micelial, calculado al quinto día de incubación.
- Efecto de extractos etanólicos de brotes *in vitro* de quillay en el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* Pers. (A) Cinética de crecimiento diaria; (B) Porcentage de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* calculado al quinto día de incubación.
- Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la germinación de conidias de *B. cinerea* Pers.
- 17 Efecto de soluciones del extracto etanólico de quillay *in vitro* en el 67 crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* Pers.

18	Efecto de extractos de quillay <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , en el crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> Pers.	69
19	Efecto del extracto etanólico de brotes <i>in vitro</i> de quillay en la habilidad de <i>B. cinerea</i> de colonizar hojas de tomate.	72
20	Efecto del extracto etanólico de brotes <i>in vitro</i> de quillay en el grado de infección por <i>B. cinerea</i> en frutos de frutilla.	73
21	Efecto del extracto etanólico de brotes <i>in vitro</i> de quillay en el consumo de oxígeno de conidias de <i>B. cinerea</i> Pers.	75
22	Efecto del extracto etanólico de brotes <i>in vitro</i> de quillay en la integridad de la membrana plasmática de hifas B. <i>cinerea</i> Pers.	79
23	Efecto del extracto etanólico de brotes <i>in vitro</i> de quillay en la concentración de fósforo y potasio en el medio de incubación de <i>B. cinerea</i> Pers.	80
24	Efecto del extracto etanólico de brotes <i>in vitro</i> de quillay en el contenido de $H_2O_2$ en el medio de incubación de <i>B. cinerea</i> Pers.	83
25	Efecto del extracto etanólico de brotes <i>in vitro</i> de quillay en la producción de malonildialdehído (MDA) en <i>B. cinerea</i> Pers.	85
26	Efecto del extracto etanólico de brotes <i>in vitro</i> de quillay en la actividad de enzimas antioxidantes de <i>B. cinerea</i> Pers.	88

- 27 Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la 91 producción y actividad *in vitro* de cutinasa en *B. cinerea* Pers.
- 28 Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la 94 producción y actividad *in vitro* de poligalacturonasa en *B. cinerea* Pers.
- 29 Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la 98 producción y actividad *in vitro* de lacasa en *B. cinerea* Pers.
- 30 Efecto de soluciones del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay y de las fracciones asiladas, en el crecimiento micelial *in vitro* de *B*. *cinerea* Pers.
- 31 Cromatograma HPLC de una solución acuosa de Quillaja Ultra Powder. 103
- Cromatogramas, obtenidos del análisis por HPLC para la detección de saponinas, de extractos acuosos (A) y etanólicos (B) de brotes *in vitro* de quillay.
- Equivalentes de saponina (g 100g peso seco<sup>-1</sup>) en extractos acuosos y 105 etanólicos de brotes *in vitro* de quillay.
- 34 Equivalentes de saponina (μg mg de muestra<sup>-1</sup>) en el extracto etanólico 107 de brotes *in vitro* de quillay y las fracciones activas del mismo.
- 35 Cromatogramas, obtenidos del análisis por HPLC para la detección de 110 compuestos fenólicos, del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay.

# ÍNDICE DE TABLAS

Γabla		Página
1	Clasificación taxonómica de Botrytis cinerea y Botryotinia fuckeliana.	6
2	Principales usos tradicionales del quillay en Chile.	34
3	Principales aplicaciones industriales de las saponinas de quillay.	35
4	Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog.	43
5	Gradiente de solventes utilizado en la detección de compuestos fenólicos	58
6	Rendimiento de las fracciones del extracto etanólico de brotes <i>in vitro</i> de quillay.	101
7	Concentración de compuestos fenólicos, detectados por HPLC, en el extracto etanólico de brotes <i>in vitro</i> de quillay.	109

#### RESUMEN

Las enfermedades fúngicas constituyen uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta a los cultivos en Chile, siendo una de las más importantes la "pudrición gris", cuyo agente causal es el hongo *Botrytis cinerea* Pers. La mayor parte de las estrategias de control de este patógeno se basan en el uso de fungicidas químicos sintéticos. Sin embargo, la utilización de estos productos se ha vuelto cada vez menos eficaz y más restringida debido a la aparición de cepas altamente resistentes y a los efectos ambientales negativos que derivan de su uso indiscriminado. Ésto, sumado a la creciente demanda por agroquímicos ambientalmente seguros generada por sistemas de agricultura alternativa que promueven la producción sustentable y sana de alimentos, ha incentivado el desarrollo de investigaciones orientadas a proporcionar estrategias de control alternativas, entre las cuales se encuentra el uso de plantas como fuente de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas.

Estudios con extractos de quillay (*Quillaja saponaria* Molina), han demostrado su actividad antifúngica en una serie de hongos fitopatógenos, la cual se explicaría fundamentalmente por la presencia de saponinas. Sin embargo, la alta demanda por la corteza de este árbol, una de las principales fuentes de saponinas triterpénicas en el mundo, el cambio de uso de los suelos y el bajo nivel de reproducción por semillas, han disminuido la existencia de ejemplares adultos amenazando seriamente la preservación de la especie. El cultivo *in vitro* de plantas constituye una herramienta biotecnológica que proporciona una alternativa para la obtención de una fuente continua de biomasa vegetal, sin arriesgar la conservación del germoplasma.

Considerando estos antecedentes, el objetivo general planteado en esta investigación fue evaluar y caracterizar la actividad antifúngica de la especie *Q. saponaria* cultivada *in vitro* en un aislado de *B. cinerea* asociado a cultivos de importancia agrícola.

En este estudio se logró implementar exitosamente un sistema de propagación *in vitro* de quillay a partir de yemas axilares de ejemplares en condiciones naturales de crecimiento, lo que representa un aporte al desarrollo de técnicas biotecnológicas para el estudio y utilización comercial de esta especie, sin afectar su preservación como recurso nativo.

Los extractos crudos de brotes *in vitro* de quillay redujeron significativamente la germinación de conidias y el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*, lo que se tradujo en una disminución de los niveles de infección por el patógeno a nivel foliar y de frutos en condiciones *in vivo*. La acción fungitóxica del extracto fue comparable a la de fungicidas comerciales, aunque levemente inferior a la de extractos de hojas de quillay en condiciones naturales de crecimiento.

A nivel de mecanismos de acción, el extracto etanólico de quillay *in vitro*: alteró en forma moderada el proceso de respiración celular y la permeabilidad de la membrana plasmática; disminuyó la actividad de enzimas antioxidantes (CAT y SOD) e incrementó moderadamente los niveles de peróxido de hidrógeno y lipoperoxidación de membranas; redujo significativamente la producción de cutinasa y poligalacturonasa; e inhibió significativamente la actividad lacasa *in vitro*; en *B. cinerea*.

El hecho de que la acción fungitóxica de ninguna de las fracciones aisladas superara la actividad del extracto total, plantea el uso del extracto crudo de quillay *in vitro* como potencial fungicida, lo cual reduciría tanto el costo de obtención del producto, como el riesgo de desarrollo de resistencia en el patógeno.

Los brotes de quillay obtenidos mediante cultivo *in vitro* acumularon saponinas, lo que permite proponer al cultivo *in vitro* de plantas como una herramienta biotecnológica para la obtención de estos metabolitos. El extracto etanólico de quillay *in vitro* además contiene compuestos fenólicos, tales como los ácidos clorogénico, caféico y *p*-coumárico, esculetina, escopoletina, rutina, naringenina y quercetina, los cuales han sido identificados como metabolitos fungitóxicos para hongos fitopatógenos en otras especies vegetales.

Los resultados de esta tesis sugieren que el cultivo *in vitro* de quillay representa una alternativa interesante para la obtención de extractos con propiedades antifúngicas en *B. cinerea*, que no arriesga la preservación de esta especie nativa, cuya actividad se debería, al menos en parte, a la presencia de saponinas y compuestos fenólicos.

#### **ABSTRACT**

Fungal diseases constitute one of the main phytosanitary problems that affect crops in Chile, being perhaps the most important "gray mold", whose causal agent is *Botrytis cinerea* Pers. The most of the control strategies for this fungus have been based on the use of synthetic fungicides. Nevertheless, this method has become less effective and more restricted due to the appearance of highly resistant isolates and to the negative environmental effects that derive from the indiscriminate use of these products. This, in addition to the increasing demand by environmentally safe agrochemicals generated by alternative agriculture systems that promote the sustainable and healthy production of foods, has stimulated the development of research oriented to provide alternative control strategies, being the use of plants as a source of secondary metabolites with antifungal properties, one of them.

Studies with extracts of quillay (*Quillaja saponaria* Mol.), an endemic Chilean tree, have demonstrated their antifungal activity against some phytopathogenic fungi, which is explained principally by the presence of saponins, the main secondary metabolites in this specie. The high demand by quillay cortex, one of the most important sources of triterpenic saponins in the world, along with a progressive replacement of forests by crops and the low natural reproduction by seeds, are seriously threatening the preservation of this native specie. As an alternative to this problem, the *in vitro* culture of plants constitutes a biotechnological tool that provides a method for the obtaining of a continuous source of vegetal biomass, without risking the germplasm conservation.

According to these antecedents, the main goal of this research was to evaluate and characterize the antifungal activity of *Q. saponaria in vitro* plants against an isolate of *B. cinerea* associated to agriculturally important crops.

In this study it was implemented a successful system of quillay *in vitro* propagation from axillary buds of naturally grown trees, which represents a contribution for the development of biotechnological techniques for the study and commercial use of this specie, without affect its preservation as native resource.

Quillay extracts from *in vitro* shoots significantly reduce conidia germination and *in vitro* mycelial growth of *B. cinerea*. In addition, the infection levels, under *in vivo* conditions, of tomato detached leaves and strawberry fruits treated with this extract were diminished. The fungitoxic activity of the extracts was similar to the fungicidal action of natural and synthetic commercial fungicides but slightly lower than the antifungal effect of quillay leaves extract from trees naturally grown.

The ethanolic extract of *in vitro* quillay moderately altered the process of cellular respiration and the plasmatic membrane permeability, decreased the antioxidant enzyme activity (CAT and SOD) and moderately increased the levels hydrogen peroxide and membrane lipoperoxidation, significantly reduced the production of cutinase and polygalacturonase, and highly inhibited the *in vitro* laccase activity, on *B. cinerea*.

The antifungal action of none of the fractions isolated was higher than fungitoxic effect of total extract. The use of the crude extract as potential fungicide reducing both, the cost of product obtention and the risk of fungal resistance development.

The fact that *in vitro* shoots of quillay accumulated saponins, allow proposing the *in vitro* culture of plants as an alternative tool for the obtaining of these metabolites. In addition, the ethanolic extract of *in vitro* quillay contains phenolic compounds such as chlorogenic, caffeic and *p*-coumaric acids, esculetin, scopoletin, rutin, naringenine and quercetin, which have been identified as antifungal compounds on phytopathogenic fungi in other plant species.

The results of this thesis suggest that the *in vitro* quillay culture constitutes an interesting biotechnological method to obtain environmental safe antifungal extracts to control *B. cinerea* without risking the preservation of this endemic specie, whose fungitoxic activity could be explained, at least partly, by the presence of saponinas and phenolic compounds.

## 1 INTRODUCCION

#### 1.1 Antecedentes Generales

Las enfermedades fúngicas constituyen uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta a los cultivos en Chile, siendo una de las más importantes la "pudrición gris", cuyo agente causal es el hongo *Botrytis cinerea* Pers. (Jarvis, 1977; Jarvis, 1980; Álvarez, 1982). Este patógeno infecta a más de 200 especies vegetales (Latorre, 1986; Benito *et al.*, 2000), entre las que se incluyen frutales, plantas ornamentales y una serie de hortalizas (Rosslenbroich *et al.*, 1999; Latorre *et al.*, 2001), aunque su hospedero económicamente más relevante es la vid (Alvaréz, 1982; Latorre, 1986). Las infecciones por este hongo afectan no sólo el rendimiento, sino además la calidad de los cultivos, provocando deterioros de gran magnitud incluso durante las etapas transporte y almacenaje de los productos agrícolas (Elad, 1988; Hammer *et al.*, 1990; Berrie, 1994; Rosslenbroich y Stuebler, 2000).

Durante los últimos 50 años, el control de *B. cinerea* se ha basado fundamentalmente en el uso de fungicidas químicos sintéticos (Rosslenbroich y Stuebler, 2000), siendo los más extensivamente usados benzimidazoles y dicarboximidas (Latorre, 1986 y 1989; Morales y Nualart, 1995, Latorre *et al.*, 2001). Sin embargo, la utilización de estos productos se ha vuelto cada vez menos eficaz debido a que el patógeno ha logrado desarrollar cepas altamente resistentes a ambos productos (Pommer y Lorenz, 1982; Steel y Nair, 1993; Latorre *et al.*, 1994; Yourman y Jeffers, 1999). A partir de mediados de los 90' se encuentran disponibles en el mercado nuevos compuestos sintéticos orientados al control de este hongo, los cuales incluyen las anilinopirimidinas, el fenilpirrol fludioxonil y la hidroxianilida fenhexamid (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). No obstante, la gran capacidad de *B. cinerea* de adaptarse rápidamente a nuevos productos de control (Latorre *et al.*, 2002; Sergeeva *et al.*, 2002; Leroux, 2004) crea la necesidad de desarrollar constantemente nuevos botriticidas (Brent y Hollomon, 1998; Rosslenbroich y Stuebler, 2000; Bajwa *et al.*, 2003). Por otra parte, el uso indiscriminado de fungicidas sintéticos, debido a su persistencia, ha generado una serie de problemas ambientales, incluyendo la contaminación de suelos y aguas (Hayes y Laws, 1991;

Latorre, 1986; Morales y Nualart, 1995; Paulitz y Bélanger, 2001), por lo que actualmente la utilización de varios de ellos esta siendo regulada gubernamentalmente (Elmer y Reglinski, 2006; Chapagain *et al.*, 2007). Ésto, sumado a la creciente demanda por agroquímicos ambientalmente seguros generada por sistemas de agricultura alternativa que promueven la producción sustentable y sana de alimentos, ha llevado a proponer y desarrollar estrategias de control alternativas, entre las cuales se incluye el uso de plantas como fuente de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas (Macías *et al.*, 1998; Fiori *et al.*, 2000; Ramírez-Chávez *et al.*, 2000; Chapagain *et al.*, 2007).

La mayoría de las especies vegetales sintetizan metabolitos antimicrobiales que inhiben las infecciones por hongos fitopatógenos, ya sea como parte de su programa normal de crecimiento y desarrollo, o en respuesta al ataque de patógenos y otras condiciones de estrés (Morrissey y Osbourn, 1999; Osbourn, 1999; Lambers *et al.*, 2000). Muchos de estos compuestos han sido caracterizados químicamente, y su importancia, tanto en la prevención como control de enfermedades fúngicas vegetales, ha sido demostrada (Duke, 1990; Jeandet *et al.*, 2002). En este contexto, extractos, aceites esenciales o metabolitos secundarios con actividad antifúngica derivados de plantas, pueden ser utilizados en el control de enfermedades vegetales (Fiori *et al.*, 2000). Los productos naturales de plantas presentan una serie de ventajas con respecto a los fungicidas sintéticos, tales como una baja toxicidad, menor residualidad y una alta selectividad (Tewari, 1990, Rao, 1990, Badei *et al.*, 1996; Bishop y Thornton, 1997), por lo que pueden ser ideales candidatos para su uso como agroquímicos (Duke, 1990; Macías *et al.*, 1998; Aplablaza *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003).

Estudios con extractos de quillay (*Quillaja saponaria* Molina), especie endémica Chilena, han demostrado su actividad antifúngica en una serie de hongos fitopatógenos (Villegas, 1999; Apablaza *et al.*, 2002; Moya, 2003; Chapagain *et al.*, 2007), la cual se explicaría principalmente por la presencia de saponinas (Segal y Schlösser, 1975; Schönbeck y Schlösser, 1976). Sin embargo, la explotación de poblaciones naturales de quillay a través de prácticas de manejo inadecuadas, el progresivo reemplazo de los bosques por cultivos, el bajo nivel de reproducción por semillas (Copaja *et al.*, 2003; Prehn *et al.*, 2003), y la alta demanda por la corteza de esta especie para la obtención y comercialización de saponinas (van Setten y

van der Werken, 1996; San Martín y Briones, 1999; Copaja *et al.*, 2003), han disminuido la existencia de árboles adultos, amenazado seriamente su preservación (Prehn *et al.*, 2003)

El cultivo *in vitro* de plantas constituye actualmente una herramienta biotecnológica que proporciona una alternativa para la obtención de una fuente continua de biomasa vegetal generadora de productos naturales, sin arriesgar la conservación del germoplasma (Hopkins, 1995; Bhojwani y Razdan, 1996). Varios estudios han demostrado que tejido vegetal proveniente de cultivo *in vitro* es capaz de producir compuestos específicos en concentraciones similares que plantas intactas en condiciones *in vivo* (Calva-Calva *et al.*, 2002; Vanisree *et al.*, 2004). Así, los considerables avances de la última década en el área de la biotecnología vegetal, han dado la oportunidad de que las plantas puedan ser consideradas como verdaderos biorreactores para la producción de metabolitos secundarios de interés (Calva-Calva *et al.*, 2002; Vanisree *et al.*, 2004).

De acuerdo a estos antecedentes, el trabajo de investigación que sustenta esta tesis de doctorado, se basa en las hipótesis que a continuación se describen.

# 1.2 Hipótesis de Trabajo

La especie *Quillaja saponaria* Mol. cultivada *in vitro* exhibe actividad antifúngica en *Botrytis cinerea* Pers., la cual se explicaría en parte por la presencia en sus tejidos de metabolitos secundarios con propiedades fungicidas.

La efectividad y características de los extractos evaluados, fracciones aisladas y/o compuestos bioactivos obtenidos de la especie en estudio, permitiría su utilización en la formulación de fungicidas naturales para el control del patógeno en cultivos de importancia agrícola.

# 1.3 Objetivo General

El objetivo general de esta investigación fue evaluar y caracterizar la actividad antifúngica de la especie *Quillaja saponaria* Mol. cultivada *in vitro* en un asilado de *Botrytis cinerea* Pers. asociado a cultivos de importancia agrícola.

## 1.4 Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* en *B. cinerea* de extractos acuosos e hidroalcohólicos de quillay *in vitro*.
- Identificar el posible mecanismo de acción de los extractos antifúngicos.
- Realizar el fraccionamiento de los extractos activos y evaluar la fungotoxicidad *in vitro* en *B. cinerea* de cada fracción.
- Identificar compuestos con actividad antifúngica que expliquen la actividad antifúngica del extracto, mediante técnicas cromatográficas y analíticas.

# 2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

# 2.1 Botrytis cinerea Pers., agente causal de la pudrición gris

B. cinerea es un hongo fitopatógeno que causa importantes pérdidas económicas en un amplio rango de cultivos de importancia agrícola (Antonov et al., 1997), constituyendo actualmente en Chile y otros países, uno de los principales problemas fitosanitarios (Latorre, 1986; Latorre y Vásquez, 1996; Latorre et al., 2001). Este patógeno puede atacar a los cultivos en cualquier estado de su desarrollo e infectar cualquier parte de la planta, colonizando hojas, tallos, flores, tubérculos y frutos (Elad, 1997; Muckenschnabel et al., 2002), por lo que las infecciones por este hongo afectan no sólo el rendimiento, sino además la calidad de los cultivos, provocando deterioros de gran magnitud incluso durante las etapas transporte y almacenaje de los productos agrícolas (Elad, 1988; Hammer et al., 1990; Berrie, 1994; Rosslenbroich y Stuebler, 2000).

## 2.1.1 Etimología y clasificación taxonómica

La etimología del género Botrytis deriva del Griego *botrys*, que significa "grupos de uvas", por la organización de sus conidias en forma de racimos, mientras el nombre de la especie deriva del Latín del latín *cinereus-a-um* (de color grisáceo o ceniza), aludiendo al color grisáceo de las esporas acumuladas en el tejido vegetal infectado (Agrios, 1997).

El nombre *B. cinerea* aparece por primera vez mencionado por von Haller (1771), en su "*Synopsis Methodica Fungorum*". En 1866, de Bary descubre la conexión genética entre este patógeno y *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). Posteriormente este último fue identificado como el estado perfecto o sexual (telomorfo) del patógeno, sin embargo ocurre raramente en la naturaleza (Faretra *et al.*, 1988) por lo que el nombre del estado imperfecto o asexual (anamorfo): *B. cinerea*, es comúnmente preferido para referirse a este hongo (XIth International Botrytis Conference, 1996, Wageningen, The Netherlands; *En*: ten Have, 2000). En la Tabla 1, se muestra la clasificación taxonómica de ambos estados del patógeno.

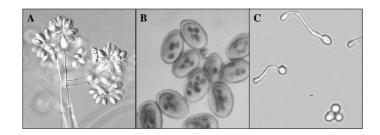
Tabla 1. Clasificación taxonómica de Botrytis cinerea y Botryotinia fuckeliana

	Estado asexual	Estado sexual
Reino	Fungi	Fungi
División	Deuteromycota	Ascomycota
Clase	Hyphomycetes	Discomycetes
Orden	Moniliales	Helotiales
Familia	Moniliaceae	Sclerotiniaceae
Género	Botrytis	Botryotinia
Especie	Botrytis cinerea	Botryotinia fuckeliana

Adoptado de: ten Have, 2000

# 2.1.2 Morfología y proceso de infección

B. cinerea produce conidias multinucleadas, heterocaríoticas (Edlich et al., 1989; Agrios, 1997), hialinas o levemente coloreadas, unicelulares, ovoides o esféricas, sobre pequeños esterigmas en el extremo de conidióforos ramificados (Agrios, 1997; Latorre y Rioja, 2002). El patógeno posee hifas septadas ramificadas (Agrios, 1997) y forma una variedad de estructuras de penetración, incluyendo apresorios, con los cuales invade la epidermis del tejido vegetal (Salinas et al., 1986). Además, las especies del género Botrytis producen esclerocios (Honda y Mizumara, 1991), que actúan como estructuras de resistencia para proteger al patógeno de condiciones climáticas desfavorables (ten Have, 2000). En la Figura 1, se muestran algunas estructuras morfológicas de este hongo.



**Figura 1.** Morfología de *Botrytis cinerea* Pers. A) Conidióforos; B) Conidias; C) Conidias en germinación. **Adoptado de:** Biodiversity References, Biological Science-University of Paisley. http://www-biol.paisley.ac.uk/bioref/index2.html; Fotografías © A.J. Silverside.

El proceso de infección de *B. cinerea* consta de cuatro etapas (Mendger y Deising, 1993). En la primera, ocurre la adherencia de las conidias a la superficie vegetal (Jones, 1994). Luego, comienza el proceso de germinación, en el que las conidias dormantes producen el tubo germinativo, el cual al entrar en contacto con el tejido hospedero forma la hifa de infección (Hamer *et al.*, 1987). Los tubos germinativos penetran el tejido de la planta hospedera generalmente a través de heridas (Staples y Mayer, 1995) o por aperturas naturales (estomas y/o lenticelas) (Jarvis, 1977; Staples y Mayer, 1995). Sin embargo, al ser un microorganismo necrotrófico, este patógeno además es capaz de inducir la muerte de la célula vegetal para facilitar la colonización del tejido hospedero mediante la secreción de enzimas hidrolíticas (Jarvis, 1977; Baker y Bateman, 1978; Mendger *et al.*, 1996; Govrin y Levine, 2000; Benito *et al.*, 2000). Finalmente, se produce la invasión de las células adyacentes hasta abarcar la totalidad del tejido (Kolattukudy, 1981 y 1985).

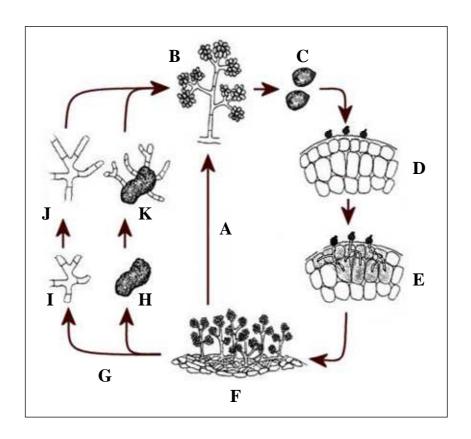
B. cinerea produce una serie de enzimas involucradas en el proceso de patogénesis, incluyendo pectinasas, tales como endo y exo pectin liasas (PL) (Movahedi y Heale, 1990), que hidrolizan el enlace glicosídico del polímero de pectina (Baker y Bateman, 1978), endo y exo poligalacturonasas (PG) (Johnston y Williamson, 1992 a y b), las cuales catalizan la hidrólisis de poligalacturonatos a moléculas de menor peso molecular (Baker y Bateman, 1978) y pectin metilesterasas (Reignault et al., 1994), que son capaces de desmetilar la pectina (Baker y Bateman, 1978). Además, este hongo produce cutinasas (Salinas et al., 1986; Salinas y Verhoeff, 1995), serina esterasas que hidrolizan el enlace éster de la cutina (Baker y Bateman, 1978), proteasas (Movahedi y Heale, 1990), enzimas involucradas en la detoxificación de compuestos vegetales antifúngicos, tales como las lacasas (Pezet et al., 1991; Slomczynski et al. 1995; Kars y van Kan, 2004) y fitotoxínas (botridiales), las cuales contribuyen al proceso de patogénesis (Collado et al., 1995; Benito et al., 2000).

Las condiciones en que el proceso de infección ocurre dejan en evidencia la gran adaptabilidad del patógeno. Se ha reportado que las conidias germinan a una humedad relativa de más de un 90% (Marois *et al.*, 1988; Salinas *et al.*, 1989; Yunis *et al.*, 1990; Latorre *et al.*, 2002) y a un rango de temperatura entre 1 a 30° C, con un óptimo entre 18 y 20° C. Esta flexibilidad extrema conlleva a que un cierto nivel de inóculo exista en casi todas partes y a que la

extensión epidemiológica de la enfermedad pueda ser inhibida sólo cuando prevalecen condiciones secas (Rosslenbroich, 1999; Latorre y Rioja, 2002).

## 2.1.3 Ciclo de vida

*B. cinerea* es un hongo parasito facultativo, por lo que puede crecer ya sea como saprofito en tejidos necróticos (Rosslenbroich, 1999), o bien como parásito (Elad, 1995). El ciclo de vida de este patógeno se ilustra en la Figura 2.

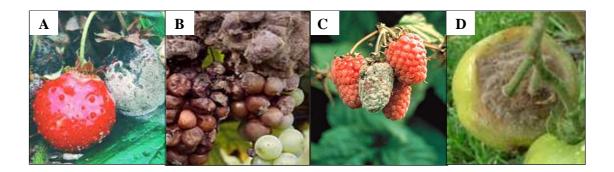


**Figura 2.** Ciclo de vida de *Botrytis cinerea* Pers. A) Ciclo de verano; B) Conidióforos; C) Conidias; D) Conidias adheridas al hospedero; E) Las conidias germinan, y los tubos germinativos penetran e invaden el tejido vegetal; F) Conidióforos producidos en el tejido vegetal infectado; G) Después del invierno; H) Esclerocios; I) Micelio; J) El micelio crece para formar conidióforos y K) Los esclerocios germinan para producir micelio, el cual producirá conidióforos. **Adoptado de**: Agrios, 1997 (Imagen: www.thewinedoctor.com).

Durante la época invernal es posible detectar al hongo en forma de micelio en tejido vegetal en descomposición, o como esclerocios. Pasado el invierno, el micelio crece y los esclerocios germinan para producir micelio, el cual produce conidióforos. Las conidias son liberadas desde los conidióforos hasta llegar al hospedero y bajo condiciones climáticas favorables, comienza el proceso de infección. Una vez que las conidias entran en contacto con el hospedero, éstas producen micelio, el cual invade el tejido provocando la desintegración de las células vegetales, el tejido se ablanda y pudre. El micelio en el tejido infectado vuelve a producir conidióforos y se liberan nuevas conidias. El proceso continúa y al invierno siguiente el hongo vuelve al estado de hibernación (Agrios, 1997).

# 2.1.4 Síntomas, signos y rango de hospederos

Los síntomas provocados por este patógeno, incluyen: pudrición en frutos y tubérculos, marchitez del tejido, pústulas y manchas foliares, caída de plántulas (Hausbeck y Moorman, 1996), cancros en los tallos, y tizones en inflorescencias (Hausbeck y Moorman, 1996; Kim y Cho, 1996). *B. cinerea* produce un micelio blanquecino y de aspecto lanoso en el tejido infectado, el cual se vuelve gris durante la esporulación, lo que puede ocurrir dentro de unos pocos días luego de que la infección se ha iniciado, debido a ésto, las enfermedades causadas por este hongo son comúnmente denominadas "pudrición gris" (ten Have, 2000; Latorre, 2004). En la Figura 3, se muestran algunos de los síntomas y signos (expresión visible del patógeno en el hospedero; Latorre, 2004) del ataque por *B. cinerea* en cultivos de importancia agrícola.



**Figura 3.** Síntomas y signos del ataque por *Botrytis cinerea* en algunas especies vegetales de importancia agrícola. A) Frutilla, B) Uvas, C) Frambueso y D) Tomate. **Adoptado de:** http://articulos.infojardin.com/PLAGAS\_Y\_ENF/Enfermedades/Botritis.htm

Este patógeno infecta principalmente especies dicotiledóneas y monocotiledóneas nogramináceas (Jarvis, 1977; Agrios, 1997; Latorre, 2004), siendo uno de los patógenos más importantes en plantas cultivadas en condiciones de invernadero (Kiso, 1988). El hongo tiene una posición especial dentro del género Botrytis, el cual está constituido por 22 especies de hongos (Hennebert, 1973) y que se caracteriza por infectar un rango restringido de especies vegetales (ten Have, 2000), ya que para *B. cinerea* se han identificado al menos 235 plantas hospederas (Jarvis, 1977), entre las que se incluyen frutales, plantas ornamentales y una serie de hortalizas, aunque su hospedero económicamente más relevante en nuestro país es la vid (Alvaréz, 1982; Latorre, 1986).

## 2.1.5 Métodos de control fitosanitario

En Chile y otros países, durante los últimos 50 años el control de este patógeno se ha basado fundamentalmente en el uso de fungicidas químicos sintéticos (Rosslenbroich y Stuebler, 2000), siendo los más extensivamente usados, benzimidazoles y dicarboximidas (Latorre, 1986 y 1989; Morales y Nualart, 1995, Latorre *et al.*, 2001). Sin embargo, la utilización de estos productos se ha vuelto cada vez menos eficaz debido al desarrollo de cepas altamente resistentes a ambos productos (Pommer y Lorenz, 1982; Steel y Nair, 1993; Latorre *et al.*, 1994; Yourman y Jeffers, 1999).

A partir de mediados de los años 90 se encuentran disponibles en el mercado nuevos compuestos sintéticos con actividad fungicida en *B. cinerea*, entre los que destacan las anilinopirimidinas (ciprodinil, pirimetanil y mepanipirima), el fenilpirrol fludioxonil y la hidroxianilida fenhexamid (Rosslenbroich y Stuebler, 2000).

Dado su perfil de inhibición y translocación sistémica, las anilinopirimidinas poseen actividad protectiva y curativa contra este hongo (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). Pirimetanil es capaz de inhibir la biosíntesis de metionina (Fritz *et al.*, 1997) y la secreción de proteínas extracelulares, incluyendo hidrolasas fúngicas asociadas con la patogénesis del hongo (Miura *et al.*, 1994; Milling y Richardson, 1995).

Por otro lado Fludioxonil induce alteraciones morfológicas en tubos germinativos y estallido celular (Leroux, 1996), efectos similares a los provocados por las dicarboximidas, sin embargo, el desarrollo de resistencia cruzada entre ambos tipos de fungicidas en *B. cinerea*, no es considerado un problema de importancia práctica (Hilber *et al.*, 1995).

Una de las opciones más nuevas para el control químico de este hongo, es el uso de fenhexamid (Kuck *et al.*, 1997; Rosslenbroich *et al.*, 1998), un fuerte inhibidor de la elongación de tubo germinativo y el crecimiento de micelio del patógeno (Hänβler y Pontzen, 1999; Rosslenbroich, 1999). Este producto posee un mecanismo de acción diferente al de los otros botriticidas y además no exhibe resistencia cruzada con ninguno de ellos, por lo que puede ser utilizado como una buena herramienta en las estrategias de manejo anti-resistencia en programas del control del hongo (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). Se ha reportado que este fungicida inhibe la biosíntesis de esterol, específicamente mediante la inhibición de la enzima 3-quetoreductasa (Debieu *et al.*, 2001).

A pesar de que actualmente se encuentran disponibles en el mercado fungicidas sintéticos relativamente efectivos para el control de este patógeno, la gran capacidad, a veces sorprendente de *B. cinerea* de adaptarse rápidamente a nuevos productos de control (Latorre *et al.*, 2002; Sergeeva *et al.*, 2002; Leroux, 2004), crea la necesidad de desarrollar constantemente nuevos botriticidas (Brent y Hollomon, 1998; Rosslenbroich y Stuebler, 2000; Bajwa *et al.*, 2003).

Por otro lado, una de las prácticas estándares para el control de la pudrición gris en uvas, consiste en fumigar los frutos después de la cosecha con dióxido de azufre. Sin embargo el uso de este producto presenta una serie de limitaciones, dentro de las que se incluyen el blanqueamiento y desarrollo de lesiones a nivel de raquis y bayas, la presencia de residuos excesivos de sulfito en el tejido, la alteración del aroma y sabor del vino, la excesiva formación de sulfuro de hidrógeno y mercaptanos, y, el efecto negativo en la salud humana y en la calidad del aire (Smilanick *et al.*, 1990; Crisosto y Mitchell, 2002; Zamora, 2005).

En general, el uso indiscriminado de fungicidas químicos sintéticos, producto de su persistencia, ha generado una serie de problemas ambientales, incluyendo la contaminación de suelos y aguas (Hayes y Laws, 1991; Latorre, 1986; Morales y Nualart, 1995; Paulitz y Bélanger, 2001). Además, hoy en día se percibe un aumento en la discusión de la población con respecto a la aplicación de estos productos y la presencia de sus residuos en alimentos, ya que ambas situaciones ponen en riesgo la salud tanto de trabajadores como de consumidores (Janisiewicz y Korsten, 2002; Spadoro y Gullino, 2005; Molina *et al.*, 2006). Por ambas razones, actualmente el uso de varios pesticidas sintéticos se ha restringido y esta siendo regulado gubernamentalmente (Elmer y Reglinski, 2006; Chapagain *et al.*, 2007). Ésto, sumado a la creciente demanda por agroquímicos ambientalmente seguros generada por sistemas de agricultura alternativa, tales como la agricultura orgánica, ha incentivado el desarrollo de investigaciones orientadas a proporcionar métodos alternativos de control fitosanitario (Elad y Zimand, 1991; Zhang *et al.*, 1994).

A pesar de que los fungicidas sintéticos continúan siendo el soporte del manejo de *B. cinerea* (Molina *et al.*, 2006), estudios han demostrado la efectividad del uso de agentes de control biológico como una alternativa (Peng y Sutton, 1991; Zhang *et al.*, 1994; Swadling y Jeffries, 1995; Zhang *et al.* 1996; Sanfuentes y Ferreira, 1997; Esterio y Auger, 1997; Latorre *et al.*, 1997; Yu y Sutton, 1997, 1999; Schoene y Kohl, 1999; Schoene *et al.*, 2000; Cole *et al.*, 2004; Chaves y Wang, 2004). Esta herramienta, si bien en algunos casos ha mostrado interesantes niveles de control, presenta una serie de limitaciones, tales como su eficacia variable en condiciones de campo (McGrath y Shishkoff, 1999; Bettiol y Stadnick, 2001; Beth-Din *et al.* 1996; Paulitz y Bélanger, 2001; Elmer y Reglinski, 2006), y el alto costo de producción (Fravel, 1999; Stewart, 2001; Gerhardson, 2002; Spadoro y Gullino, 2005), lo que explicaría el que sólo una pequeña proporción de los biocontroladores que han mostrado ser efectivos en condiciones de laboratorio, hayan sido desarrollados comercialmente (Elmer y Reglinski, 2006). El uso de plantas como fuente de metabolitos secundarios con propiedades fungicidas, aparece como otra de las estrategias alternativas más estudiadas (Arnason *et al.*, 1989; Ramírez-Chávez *et al.*, 2000; Meepagala *et al.*, 2003).

Los productos naturales de plantas presentan una serie de ventajas con respecto a los fungicidas sintéticos, las que incluyen su baja toxicidad, menor residualidad y alta selectividad (Tewari, 1990, Rao, 1990, Badei *et al.*, 1996; Bishop y Thornton, 1997), por lo que pueden ser ideales candidatos para su uso como agroquímicos (Duke, 1990; Macías *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2003). Si bien el problema de desarrollo de resistencia también es aplicable a metabolitos de origen vegetal (Papadopoulou *et al.*, 1999; Bouarab *et al.*, 2002), estos compuestos se caracterizan por mantener un balance ecológico en la naturaleza, por lo que la probabilidad de que este fenómeno ocurra, es menor (Chapagain *et al.*, 2007).

## 2.2 Metabolitos secundarios de plantas con propiedades antifúngicas

Las plantas producen un amplio rango de metabolitos secundarios con actividad antimicrobial como un mecanismo de defensa contra patógenos (Rice, 1987; Osbourn, 1996a, 1999; Bennett y Wallsgrove, 1994; Morrissey y Osbourn, 1999). En este contexto, la mayoría de las especies vegetales sintetizan metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos, ya sea como parte de su programa normal de crecimiento y desarrollo, o en respuesta al ataque de patógenos y otras condiciones de stress (Duke, 1990; Grayer y Harborne, 1994; Morrissey y Osbourn, 1999; Dixon, 2001).

Compuestos antimicrobiales preformados, denominados "fitoanticipinas", están presentes constitutivamente en plantas sanas y representan barreras químicas a la infección de potenciales patógenos (Osbourn, 1996; Morrissey y Osbourn, 1999). Tales metabolitos son secuestrados en vacuolas u organelos en el tejido sano, principalmente a nivel de células epidérmicas (Grayer y Harborne, 1994; Osbourn, 1999 a y b; Morrissey y Osbourn, 1999; Dixon, 2001), ya sea en sus formas biológicamente activas o como precursores inactivos, los cuales pueden ser rápidamente liberados y/o activados en respuesta al ataque fúngico (Melton *et al.*, 1998: Osbourn, 1999 a y b; Dixon, 2001). La activación de estos compuestos involucra la acción de enzimas vegetales, las cuales son separadas por compartimentalización de sus sustratos en el tejido sano (Osbourn, 1996; Edwards y Gatehouse, 1999; Morrissey y Osbourn, 1999).

Por otro lado, las "fitoalexinas", metabolitos antimicrobiales inducidos, no se encuentran presentes en el tejido sano (van Etten *et al.*, 1995), siendo sintetizados *de novo* en respuesta al ataque por patógenos o condiciones de stress (Morrissey y Osbourn, 1999), por lo que generalmente están restringidos al tejido colonizado por el hongo y las células que rodean el sitio de infección (VanEtten *et al.*, 1994; Morrissey y Osbourn, 1999; Dixon, 2001).

Fitoanticipinas y fitoalexinas incluyen una gran diversidad de metabolitos secundarios (Osbourn, 1999; Morrissey y Osbourn, 1999; Dixon, 2001), destacando compuestos de origen fenólico, metabolitos nitrogenados y azufrados, policétidos y terpenoides (Fry y Myers, 1981; Mansfield, 1983; Bennett y Wallsgrove, 1994; VanEtten *et al.*, 1994; Grayer y Harborne, 1994; Kúc, 1992 y 1995; Morrissey y Osbourn, 1999). Se ha reportado que especies vegetales de una misma familia, por lo general hacen uso de estructuras químicas relacionadas para su defensa contra hongos (isoflavonoides en Leguminosas, sesquiterpenos en Solanáceas), sin embargo, algunas clases químicas, tales como derivados fenilpropanoides, son utilizadas para funciones defensivas en diversas familias (Morrissey y Osbourn, 1999; Dixon, 2001). A continuación se destacan algunos ejemplos de fitoanticipinas y fitoalexinas antifúngicas.

## 2.2.1 Fitoanticipinas antifúngicas

Estudios han demostrado que una serie de flavonoides actuarían como metabolitos constitutivos antifúngicos en especies vegetales (Grayer y Harborne, 1994). En este contexto, ejemplos de fitoanticipinas flavonoides incluyen: las flavonas crisina, galagina y baicalina, aisladas desde *Helichrysum nitens* Oliver & Hiern., las cuales han mostrado actividad antifúngica en el hongo *Cladosporium cucumerinum* (Tomas-Barberan *et al.*, 1988); los (2S)-7,4′-dihidroxi-, (2S)-3′,4′-dihidroxi-7-metoxi- y (2S)-7-4′-didroxi-3′-metoxi- flavanos, y las chalconas isoliquiritigenina y echinatina, sintetizados en *Bauhinia manca* Standley (Achenbach *et al.*, 1988); la flavanona 6-isopentenil naringenina desde *Humulus lupulus* L. (Mizobuchi y Sato, 1984); y las dihidrochalconas floretina y su glicósido floridizina, presentes en el follaje de manzano (*Malus domestic* L.) (Hunter y Hull, 1993). Además, varios isoflavonoides han sido identificados como fitoanticipinas fungitóxicas especialmente en especies leguminosas y árboles de la familia Rosaceae (Grayer y Harborne, 1994), tal es el caso de la luteona, aislada de la superficie foliar, raíces, tallos y frutos de lupino blanco

(Lupinus albus L.), la cual exhibe actividad antifúngica en Helmintosporium carbonum (Ingham et al., 1983) y Cladosporium herbarum (Tahara et al., 1984); y la genisteina, isoflavonoide presente como glucósido en guindo (Prunus cerasus L.) (Geibel et al., 1990).

Por otro lado, se ha documentado que algunos diterpenos presentes constitutivamente en plantas, son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Grayer y Harborne, 1994). Henricks *et al.* (1979), demostraron que el ácido 7-oxo-dehidroabiético inhibe el crecimiento de *Fomes annosus*, responsable de una de las enfermedades más importantes de coníferas en las zonas templadas del mundo. Por otro lado, se ha reportado que los ácidos 7-ceto-dehidroabiético, 7-hidroxi-dehidroabiético y 15-hidroxi-podocárpico, asilados de *Pinus radiata* D. Don., reducen significativamente el crecimiento del hongo *Dothistroma pini* (Franich *et al.*, 1983). Además, dos diterpenos neo-clerodanos presentes constitutivamente en especies del género Scutellaria (Labiateae), clerodin y jodrellina B, se han identificado como fungitóxicos para el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici (Cole *et al.*, 1991).

Las saponinas, moléculas triterpenoides, esteroides o alcaloides esteroidales glicosiladas, son metabolitos con propiedades antifúngicas que ocurren constitutivamente en una serie de especies vegetales, las cuales han sido implicadas en la resistencia de plantas a enfermedades fúngicas, siendo uno de los grupos de fitoanticipinas más estudiadas (Osbourn, 1996 a y b; Hostettmann y Marston, 1995; Morrissey y Osbourn, 1999; Papadopolou et al., 2003). Saponinas triterpénicas son sintetizadas principalmente en dicotiledóneas, mientras las del tipo esteroidales están estrictamente restringidas a monocotiledóneas (Hostettmann y Marston, 1995). Se ha demostrado que saponinas monodesmosídicas, las que poseen una única cadena de azúcar en posición C-3, exhiben una alta actividad fungitóxica (Schönbeck y Schlösser, 1976; Osbourn, 1996 a y b), mientras las bidesmosídicas son biológicamente inactivas siendo convertidas a monodesmosídicas en respuesta al daño del tejido por acción de glicosil hidrolasas específicas de plantas (Lüning y Schlösser, 1975; Schönbeck y Schlösser, 1976; Nisius, 1988; Gus-Mayer et al., 1994 a y b). Ejemplos de saponinas antifúngicas, incluyen las moléculas triterpenoides avenacina A-1 (monodesmosídica) y los avenacosidos A y B (bidesmosídicas), producidas en avena (Avena sativa L.), y los alcaloides esteroidales αtomatina y α-chaconina, sintetizados en tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) y papa (Solanun tuberosum L. spp. tuberosum Hawkes), respectivamente (Tschesche et al., 1969; Tschesche y Lauven. 1971; Grayer y Harborne, 1994; Osbourn, 1996b; Morrissey y Osbourn, 1999). La resistencia de avena al hongo Gaeumannomyces graminis var. tritici, ha sido atribuida a la síntesis a nivel de raíz de avenacina (Osbourn et al., 1991; Osbourn et al., 1994), mientras la α-tomatina ha sido implicada en la resistencia de algunas variedades de tomate a Cladosporium fulvum (Dow y Callow, 1978). Por otra parte, se ha reportado que el quillay (Quillaja saponaria Mol.) sintetiza una serie de saponinas triterpénicas, glicósidos del ácido quillaico (San Martín y Briones, 1999; Nord et al., 2001), que inhiben el crecimiento de una serie de hongos fitopatógenos (Villegas, 1999; Apablaza et al., 2002; Moya, 2003; Chapagain et al., 2007). Otros ejemplos de saponinas triterpenoides antifúngicas incluyen los 3-O-\u03B-Dglucopiranosidos de la hederagenina, bayogenina y ácido medicagénico, aislados de las raíces de Dolichos kilimandscharicus Taubert (Leguminosae) (Marston et al., 1988); la sakurasosaponina, sintetizada en hojas del árbol africano Rapanea melanophloeos L. (Myrsinaceae) (Ohtani et al., 1993), y las camallidinas I y II desde las hojas de Camellia japonica L. (Theaceae), las cuales inhiben el crecimiento del hongo Pestalotia longiseta (Nagata et al., 1985). Por otra parte, las saponinas aisladas de quinoa (Chenopodium quinoa Willd.), que consisten en cantidades equimolares de glicósidos bidesmosídicos triterpénicos del ácido oleanólico, la hederagenina y el ácido fitolacagénico, actualmente se encuentran patentadas para su uso como pesticida bioquímico (Headsup®Plant Protectant) en el control de hongos fitopatógenos (Fuente: United State Environmental Protection Agency; Regulating pesticides. www.epa.gov/pesticides/biopesticides; consultado en Agosto de 2007).

Los glucósidos cianogénicos, metabolitos secundarios nitrogenados sintetizados en más de 200 especies de plantas, incluyendo gimnospermas, dicotiledóneas y monocotiledóneas (Robinson, 1983; Dewick, 2002; Singh *et al.*, 2003), constituyen otro de los importantes grupos de fitoanticipinas (Osbourn, 1996; Morrissey y Osbourn, 1999). En plantas sanas, estos compuestos son separados por compartimentalización de las enzimas que catalizan su degradación (Croteau *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2003). Así, en respuesta al daño del tejido o ataque por patógenos, los glucósidos se degradan liberando cianuro de hidrógeno (HCN) (Poulton, 1988, 1990; Osbourn, 1996; Taiz y Seiger, 1998; Morrissey y Osbourn, 1999). La degradación de estos metabolitos consta de dos etapas. En la primera, la molécula de azúcar es

separada de la estructura por la acción de una glucosidasa, mientras el producto resultante, denominado β-hidroxinitrilo, se descompone espontáneamente para liberar HCN, reacción catalizada por la enzima hidroxinitrilo liasa (Osbourn, 1996 a y b; Osbourn, 1999; Dewick, 2002). La generación de HCN, un potente inhibidor de la respiración celular, se ha reportado como un mecanismo de defensa de plantas contra hongos (Fry y Evans, 1977; Hughes, 1991; Morrissey y Osbourn, 1999). Ejemplos de glucósidos cianogénicos incluyen la amigdalina, responsable de la toxicidad de almendro amargo (*Prunus amygdalus* Basch) y otras semillas de Rosáceas; la linamarina y lotaustralina, aislados desde yuca (*Manihot esculenta* Crantz), lino (*Linum usitatissimum* L.), árbol del caucho (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.), poroto lima (*Phaseolus lunatus* L.), trébol blanco (*Triolium repens* L.) y lotera de hoja ancha (*Lotus* corniculatus L.) (Davis, 1991); y la durrina, producida en sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Osbourn, 1996b)

Los glucosinolatos, toxinas nitrogenadas glicosiladas presentes constitutivamente en miembros de la familia Cruciferae, son metabolitos activados por enzimas en respuesta al daño o ataque por patógenos en el tejido vegetal (Fenwick et al., 1983; Duncan, 1991; Osbourn, 1996 a y b; Morrissey y Osbourn, 1999), los cuales han sido implicados en la defensa de plantas contra hongos (Robinson, 1983; Mithen, 1992; Giamoustaris y Mithen, 1995 y 1997; Osbourn, 1996; Lambers et al., 2000). La activación de estos metabolitos involucra la acción de la enzima mirosinasa (tioglucosidasa), la cual genera isotiocianatos, nitrilos y tiocianatos como productos de degradación (Fenwick et al., 1983; Morrissey y Osbourn, 1999). La fungotoxicidad de varios isotiocianatos y otros productos de la hidrólisis de glucosinolatos, ha sido demostrada (Greenhalgh y Mitchell, 1976; Mithen et al., 1986; Chew, 1988; Conn et al., 1994; Giamoustaris y Mithen, 1997; Mari et al., 1996; Smolinska et al., 1997; Inyang et al., 1999). En este contexto, hongos patógenos de Brassicas tales como Lepfosphaeria maculans, Peronospora parasitica, Mycosphaerella brassicae y Alternaria sp., han mostrado ser sensibles a tales compuestos (Osbourn, 1996 a y b; Osbourn, 1999). Por otra parte, se ha reportado que los isotiocianatos inhiben la germinación de conidias y crecimiento in vitro del hongo Metarhizium anisopliae, siendo altamente activos los feniletil-, 2-clorofenil- y alilisotiocianatos (Inyang et al., 1999).

Otro grupo de fitoanticipinas son los ácidos hidroxámicos (Hx), metabolitos sintetizados en varias especies de cereales, identificados hace tres décadas en relación a la resistencia de centeno (Secale cereale L.) a enfermedades fúngicas (Niemeyer y Jeréz, 1997; Friebe, 2001). Estos compuestos existen en plantas sanas como glicósidos (Zúñiga y Massardo, 1991) los cuales, en respuesta al daño del tejido son hidrolizados enzimáticamente por acción de βglucosidasas (Niemeyer, 1988 a y b; Morrissey y Osbourn, 1999; Kruse et al., 2000; Singh et al., 2003). La enzima entra en contacto con el sustrato dando lugar a la aglicona, la cual se descompone espontáneamente a las benzoxazolinonas respectivas, de esta forma, DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazina-3-ona) da origen MBOA (6-metoxi-2benzoxazolinona) y DIBOA (2,4-dihidroxi-1,4benzoxazina-3-ona) a BOA benzoxazolinona), junto con la liberación de ácido fórmico (Niemeyer, 1988 a y b; Singh et al., 2003). Una serie de estudios han demostrado que, tanto las agliconas (bezoxazinonas) como sus productos de degradación (benzoxazolinonas), exhiben actividad antifúngica en hongos patógenos de plantas, mientras los glicósidos son inactivos (Niemeyer, 1988 a y b; Massardo et al., 1994; Glenn et al., 2003). Se ha reportado que estos metabolitos inhiben el desarrollo de hongos tales como Helminthosporium turcicum (Couture et al., 1971), Stagonospora nodorum (Baker y Smith, 1977), Microdochium nivale (Yoder y Turgeon, 1996), Fusarium moniliforme (Richardson y Bacon, 1995), Fusarium culmorum y G. graminis (Friebe *et al.*, 1998).

En la Figura 4 se muestra la estructura de algunas fitoanticipinas antifúngicas, incluyendo varias de las antes mencionadas.

$$\begin{array}{c} R_2 \\ R_3 \\ R_4 \\ R_1 \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{c} R_1 \\ R_2 \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ C$$

**Figura 4.** Estructura de algunas fitoanticipinas con actividad antifúngica. (1) R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=OMe, R<sup>3</sup>=R<sup>4</sup>=H: crisina dimetil éter; (2) R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=R<sup>3</sup>=OMe, R<sup>4</sup>=H: galangina trimetil éter; (3) R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=R<sup>4</sup>= OMe, R<sup>3</sup>= H: baicalina trimetil éter; (4) R=iPr, R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=O: ácido 7-cetodehidro-abiético; (5) R=iPr, R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=H: ácido 7-hidroxidehidro-abiético; (6) R=OH, R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H: ácido 15-hidroxi-podocárpico; (7) R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=CH<sub>2</sub>OH: bayogenina; (8) R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=COOH: ácido medicagénico; (9) avenacina A-1; (10) α-chaconina; (11) durrina; estructura general de: (12) glucósido cianogénico, (13) isotiocianato, (14) nitrilo y (15) tiocianatos; (16) R=OMe: DIMBOA; (17) R=OMe: MBOA; (18) R=H: DIBOA y (19) R= H: BOA.

## 2.2.2 Fitoalexinas antifúngicas

Varios estudios han demostrado que algunas cumarinas actuarían como fitoalexinas antifúngicas en una serie de familias de plantas (Grayer y Harborne, 1994; Minamikawa et al., 1992). En este contexto, en respuesta a la infección por el hongo Ceratosystis fimbriata, el tejido de papa dulce (S. tuberosum L. ssp. andígena) produce umbeliferona, escopoletina, esculetina y escopolina (Uritani y Hoshiya, 1953; Minamikawa et al., 1964; Minamikawa et al., 1992). Por otro lado, se ha reportado que la escoparona (6,7-dimetoxicumarina), es la principal fitoalexina involucrada en el mecanismo de defensa inducida de cítricos contra los hongos Phytophthora gummosis (Afek et al., 1986), Guignardia citricarpa (De Lange et al., 1976), Penicillium digitatum (Kim et al., 1992; Afek et al., 1999) y Diaporthe citri (Arimoto et al., 1986). Además, Gutiérrez et al. (1995) demostraron que el tejido aéreo de plantas de girasol (Helianthus annuus L.) produce ayapina y escopoletina, metabolitos que además se acumulan en secciones de tallos longitudinales de la misma especie, luego de la inoculación con el hongo patógeno Alternaria helianthi y el hongo no-patogénico H. carbonum (Tal y Robeson, 1986 a y b).

Los estilbenos, compuestos fenólicos sintetizados en especies de las familias Vitaceae, Pinaceae, Leguminosae y Polygonaceae, representan uno de los grupos de fitoalexinas más estudiados (Gorham, 1980; Robinson, 1983; Morrissey y Osbourn, 1999; Celimene *et al.*, 1999; Jeandet *et al.*, 2002). Estudios han demostrado que estos metabolitos inhiben el crecimiento de hongos patógenos de plantas, tales como *C. cucumerinum, Pyricularia oryzae* (Langcake y Pryce, 1976), *Plasmopara viticola* (Langcake, 1981; Dercks y Creasy, 1989) y *Sphaeropsis sapinea* (Celimene *et al.*, 2001). La infección por hongos en hojas de vides y berries, induce la síntesis de resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) y compuestos relacionados (pteroestilbenos y viniferinas), los cuales exhiben actividad antifúngica en *Rhizopus stolonifer*, *P. viticola* y *B. cinerea* (Jeandet *et al.*, 2002; Commun *et al.*, 2003). Por otro lado, las pinosilvinas, estilbenos sintetizados en pino (*Pinus sylvestris* L.), han mostrado ser fungitóxicos en los hongos de la pudrición blanca (*Trametes versicolor y Phanerochaete chrysosporium*) (Celimene *et al.*, 1999). Es interesante destacar que la enzima estilbeno oxidasa ha sido exitosamente transferida a plantas que no producen fitoalexinas estilbenos. Así, plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), tomate (*L. esculentum* Mill.) y alfalfa

(*Medicago sativa* L.) transformadas con una estibeno oxidasa de uva (*Vitis vinifera* L.) sintetizaron resveratrol y mostraron un incremento en la resistencia a los hongos *B. cinerea* (Hain *et al.*, 1993), *Phytophthora infestans* (Thomzik *et al.*, 1997) y *Phoma medicaginis* (Hipskind y Paiva *et al.*, 2000), respectivamente. Además, dos genes de una resveratrol sintasa de uva (*vst1* y *vst2*), y el de una pinosilvina sintasa (*pns*) de pino, han sido transferidos establemente a trigo (*Triticum aestivum* L.), lo cual se tradujo en un aumento de los niveles de resistencia contra los hongos *Puccinia recondita* f. sp. tritici y *Septoria nodorum* Berk en las plantas transformadas (Serazetdinova *et al.*, 2005).

Plantas de sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.) en respuesta a la infección por hongos, sintetizan 3-deoxi-antocianidinas, tales como apigeninidina, luteolinidina 5-metil éter y apigeninidina 7-metil éter, las cuales han mostrado ser tóxicas para el hongo *Colletotrichum graminicola* (Snyder y Nicholson, 1990; Wharton y Nicholson, 2000). Antocianidinas tales como luteolinidina, también han sido identificadas como fitoalexinas en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Nicholson *et al.*, 1987; Snyder y Nicholson, 1990; Brinker y Seigler, 1991; Wharton y Nicholson, 2000).

Las fitoalexinas isoflavonoides son sintetizadas principalmente en especies leguminosas (Morrissey y Osbourn, 1999; Dixon, 2001). En este contexto, los isoflavonoides kievitona y faseolidina son producidos en poroto (*Phaseolus vulgaris* L.), mientras arveja (*Pisum sativum* L.) sintetiza pisatina, garbanzo (*Cicer arietinum* L.) maackiaina, alfalfa (*M. sativa* L.) medicarpina, y soya (*Glycine max* L.) gliceolina (Graham, 1995; Graham y Graham, 2000). Estudios han demostrado que la genisteina y sus hidroxiderivados inhiben el crecimiento de los hongos *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* (Weidenbörner *et al.*, 1990). Además, las isoflavonas sintetizadas en soya y garbanzo, exhiben actividad fungicida en *Aspergillus ochraceus*, *P. digitatum* y *F. culmorum*, mientras en trébol rosado (*Trifolium pratense* L.), los isoflavonoides biochanina A y genisteina afectan el crecimiento de *R. solani*, *S. rolfsii*, *Cercospora beticola y Monilinia fructicola* (Dakora y Phillips, 1996). Se ha reportado que cultivos de pelos radicales de soya sintetizan, en respuesta a la inoculación con *Fusarium solani* f. sp. glycines, los isoflavonoides genistina, daidzina, glicitina, cumestrol y gliceolina (Lozovaya *et al.*, 2004), y que algunos pterocarpanos (derivados isoflavonoides), tales como la

medicarpina, maackiaina y 4-metoximaackiaina, y los isoflavanos vestitol, isovestitol, sativano, isosativano y arvensano, han sido identificados como fitoalexinas antifúngicas en *Trifolium campestre* Schreb. y *Trifolium dubium* Sibth. (Ingham, 1978).

La primera antraquinona en ser identificada como fitoalexina, fue el compuesto purpurina l-metil éter, asilado de la corteza de *Cinchona ledgeriana* Moens. (Wijnsma *et al.*, 1984), mientras compuestos similares fueron producidos en cultivos celulares de la misma especie en respuesta a la infección por el hongo *Phytophthora cinnamomi* (Wijnsma *et al.*, 1986). Otros ejemplos de antraquinonas antifúngicas incluyen la emodina, sintetizada en la corteza de *Rhamnus triquetra* L., la cual ha mostrado ser altamente efectiva contra la germinación de esporas de hongos de los géneros Alternaria y Fusarium, y el basidiomicete *F. annosus* (Izhaki, 2002), y la malvona A (2-metil-3-metoxi-5,6-dihidroxi-1,4-naftoquinona), identificada como una fitoalexina en la especie *Malva sylvestris* L., la cual es inducida en respuesta a la infección por el hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* (Veshkurova *et al.*, 2006).

Müller-Riebau *et al.* (1995), demostraron que los monoterpenos carvacrol y timol fueron las principales fitoalexinas antifúngicas en *Satureja timbra* L. y *Thymbra spicata* L., respectivamente, las cuales mostraron ser altamente inhibitorias en el crecimiento de *R. solani*, *F. moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora capsici*. Sin embargo, de las fitoalexinas de origen terpénico, las más ampliamente estudiadas son los sesquiterpenos (Morrissey y Osbourn, 1999; Dixon, 2001). En este contexto, risitina, lubimina y solavetivona, son los principales metabolitos antifúngicos que se acumulan en túberos de papa en respuesta a la infección por *Gibberella pulicaris* (Kúc, 1995). Otros ejemplos incluyen al hemigossipol, 6-metoxi-hemigossipol y 6-deoxi-hemigossipol, aislados de *Gossypium barbadense* L. (Bell *et al.*, 1975), y el 7-hidroxi-calameneno, producido en la madera de *Tilia europaea* L. infectada con el hongo *Ganoderma applanatum* (Burden y Kem, 1983). Por otro lado, entre las fitoalexinas diterpénicas destacan las momilactonas (Kato *et al.*, 1973; Kodama *et al.*, 1988), los fitocasanos (Koga *et al.*, 1995) y las orizalexinas (Kato *et al.*, 1993; Tamogami *et al.*, 1993), todos sintetizados en arroz (*Oryza sativa* L), los cuales han mostrado ser fungitóxicos en el hongo *Magnaporthe grisea* (Kato *et al.*, 1993; Kodama *et al.*, 1988; Koga *et al.*, 1995).

Plantas de canola (Brassica rapa L.) y remolacha (Brassica napus L.) producen, en respuesta a la infección por patógenos, un grupo de fitoalexinas azufradas que pertenecen a la familia de la brasinina (Morrissey y Osbourn, 1999), los cuales a su vez constituyen un intermediario en la ruta de síntesis de fitoalexinas relacionadas, tales como ciclobrasinina, brasilexina y brasicanal A (Pedras y Jha, 2006). Otros ejemplos de fitoalexinas identificadas en especies cultivadas de crucíferas incluyen: las wasalexinas A y B, metabolitos asilados desde wasabi (Wasabia japonica L.), sintetizado en respuesta a la infección por los hongos fitopatógenos Phoma lingam, Phoma wasabiae (Pedras et al., 1999); isalexina, brasicanal A y rutalexina, producidas en betarraga (B. napus, ssp. rapifera) (Takasugi et al., 1986; Monde et al., 1990; Pedras et al., 2004); y las caulexinas A, B y C, sintetizadas en coliflor (Brassica oleracea L. var. botrytis), las cuales han mostrado ser activas en los hongos L. maculans, R. solani y S. sclerotiorum (Pedras et al., 2006). Por otra parte, las especies silvestres de crucíferas, con algunas excepciones (Pedras et al., 2003; Pedras y Ahiahonu, 2004), sintetizan fitoalexinas del tipo camalexinas, moléculas estructuralmente similares al fungicida sintético thiabendazol (Jiménez et al., 1997; Pedras et al., 2000), las cuales han sido aisladas desde Arabidopsis thaliana L., Arabis lyrate L., Camelina sativa L. y Capsella bursa-pastoris L. (Pedras et al., 2000). Se ha demostrado que la resistencia de C. sativa y C. bursa-pastoris a diferentes hongos patógenos de brassicas, incluyendo Alternaria brassicae, se explica por la producción de camalexina (3-tiazol-2'il-indol) y compuestos relacionados, tales como la 6-metoxicamalexina (Conn et al., 1988; Jejelowo et al., 1991; Jiménez et al., 1997).

Las fitoalexinas también pueden presentar estructuras de policétidos. Tal es el caso de la 6-metoximelina, sintetizada en tejido de zanahoria (*Daucus carota* L.) en respuesta a la inoculación con hongos fitopatógenos (Fan *et al.*, 2000). Por otra parte, en el tejido de haba (*Vicia faba* L.), luego de la infección por los *B. cinerea* y *Botrytis fabae*, se producen las fitoalexinas furanoacetilénicas ácido wyrona y su metil éster wyrona (Buzi *et al.*, 2003).

En la Figura 5 se muestra la estructura de algunas de fitoalexinas antifúngicas, incluyendo varias de las antes mencionadas.

**Figura 5.** Estructura de algunas fitoalexinas con actividad antifúngica. (1)  $R^1$ =H,  $R^2$ =OH: umbeliferona; (2)  $R^1$ =MeO,  $R^2$ =OH: escopoletina; (3)  $R^1$ =MeO,  $R^2$ =MeO: escoparona; (4) resveratrol; (5)  $\epsilon$ -viniferina; (6) R=H: apigeninidina; (7) R=OH: luteolinidina; (8) pisatina; (9) keivitona; (10) emodina; (11) timol; (12) solavetivona; (13) momilactona B; (14) oryzalexinas; (15) sanginarina; (16) brasinina; (17) caulexina A; (18) camalexina y (19) ácido wyerona.

# 2.2.3 Mecanismos de acción de fitoanticipinas y fitoalexinas antifúngicas

Estudios han demostrado que los productos naturales de plantas con propiedades antifúngicas reducen el crecimiento y desarrollo de hongos fitopatógenos, a través de los siguientes mecanismos: ruptura de la membrana plasmática (Jeandet *et al.*, 2002; Domingo y López, 2003; Bouchra *et al.*, 2003; Suhr y Nielsen, 2003; Cotoras *et al.*, 2004); lisis de la pared celular y daño en el citoesqueleto (Jeandet *et al.*, 2002; Bais *et al.*, 2002); inactivación e inhibición en la síntesis de proteínas (Bar-Nun *et al.*, 1989; Bostock *et al.*, 1999; Cotoras *et al.*, 2004); inhibición de la síntesis de lípidos, ácidos grasos y ergosterol (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000); alteraciones en el proceso de respiración celular (Lambers *et al.*, 2000); inhibición de la síntesis de ácidos nucléicos (Izhaki, 2002); y alteraciones a nivel del ADN (Domingo y López, 2003). No obstante, el mecanismo de acción de sólo un limitado grupo de productos naturales fungitóxicos derivados de plantas, ha sido dilucidado en detalle, algunos de los cuales se describen a continuación.

El principal mecanismo de acción que explicaría la acción fungitóxica de las saponinas se basa en la habilidad de estos compuestos de formar complejos con los esteroles de la membrana plasmática y provocar la formación de poros transmembrana (Bangham y Horne, 1962; Glauert *et al.*, 1962; Seeman *et al.*, 1973; Price *et al.*, 1987; Fenwick *et al.*, 1992; Nishikawa *et al.*, 1984; Keukens *et al.*, 1992; Keukens *et al.*, 1995; Armah *et al.*, 1999). De acuerdo a ésto, se ha reportado que algunos glicoalcaloides esteroidales interfieren con la integridad de la membrana plasmática de hongos mediante la extracción de esteroles (Keukens *et al.*, 1992). Estudios han demostrado que la α-tomatina forma complejos con los esteroles de la membrana plasmática de hongos, específicamente con los grupos 3β-hidroxilo libres, y que tales complejos resultarían en la formación de poros transmembrana (Ito *et al.*, 2005). La agregación de complejos saponinas-esterol en la membrana sería mediada por la interacción entre los residuos de azúcar en las moléculas de saponinas. De esta forma, la cadena de azúcar unida al carbono-3 (C-3), ha mostrado ser crítica para las propiedades permeabilizantes y antifúngicas de las saponinas, por lo que la remoción de tales residuos, resulta en la pérdida de la actividad biológica de estos metabolitos (Keukens *et al.*, 1995; Armah *et al.*, 1999).

Metabolitos de tipo estilbenos, tales como el resveratrol, producen una serie de anormalidades morfológicas a nivel de conidias en B. cinerea, las cuales incluyen granulación citoplásmatica en conidias, formación de tubos germinativos curvos, detención del crecimiento de tubos germinativos, retracción protoplasmática en hifas y formación de tubos germinales terciarios en las conidias capaces de sobrevivir (Adrian, 1998; Jeandet et al., 2002). Estudios han reportado que estos compuestos además serían capaces de afectar la integridad de la membrana plasmática en hongos (Adrian et al., 1997). En este contexto, Pezet y Pont (1990) demostraron que la aplicación de una solución de pteroestilbeno a conidias dormantes de B. cinerea, induce fuertes modificaciones en el sistemas de membranas endocelulares, provocando una destrucción rápida del retículo endoplásmico y de las membranas nuclear y mitocondrial, y finalmente una completa detención del proceso de respiración celular, el citoplasma coagula y la destrucción total de las conidias culmina con la desintegración de la membrana plasmática. Además, se ha documentado que una serie de hidroxiestilbenos, especialmente aquellos que presentan grupos metoxi o sustituyentes capaces de atraer electrones en el anillo estilbeno, tales como cloruro en las posiciones 3-, 3,4- o 3,5, juegan un rol importante en la formación de complejos de transferencia de carga, favoreciendo el contacto y la afinidad con proteínas de membrana, actuando como agentes desacopladores del transporte de electrones y la fotofosforilación (Jeandet et al., 2002). Recientemente se demostró que hidroxiestilbenos, tales como resveratrol y piceatanol, son capaces de inhibir la actividad de ATPasas en hongos e inducir la disociación de proteínas chaperonas y nochaperonas, las cuales se encuentran frecuentemente asociadas al citoesqueleto (Kindl et al., 2000).

Una serie de productos naturales de plantas son capaces de afectar la producción y/o actividad de enzimas involucradas en el proceso de patogénesis de hongos fitopatógenos (Goetz *et al.*, 1999; Bostock *et al.*, 1999). En este contexto, Goetz *et al.* (1999) demostraron que una serie de ácidos fenólicos, presentes constitutivamente en bayas inmaduras de uva, fueron identificados como potentes inhibidores de la enzima estilbeno oxidasa, un tipo de lacasa de *B. cinerea*, hecho que explicaría la resistencia de las bayas a las infecciones por este patógeno. Por otra parte, los ácidos clorogénico y caféico, los cuales son los metabolitos mayoritarios en la epidermis de frutos de duranzo, siendo sus concentraciones particularmente altas en

genotipos resistentes al hongo *M. fructicola*, reducen en forma importante la actividad de la enzima cutinasa de este hongo (Bostock *et al.*, 1999). Además, el triterpenoide tetracíclico cucurbitacina, sintetizado en pepino (*Cucumis sativus* L.) y otras especies de la misma familia, inhibe la producción de lacasa extracelular *in vitro* de *B. cinerea* (Bar-Nun y Mayer, 1989), lo cual respondería a la capacidad de este compuesto de reducir la cantidad de RNAm que codifica para la enzima (Gonen *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha reportado que el ácido 3ß-hidroxikaurenóico, aislado de especies del género Pseudognaphalium, estimula la producción de las enzimas cutinasa y lacasa en *B. cinerea* (Cotoras *et al.*, 2004).

Esporas de algunos hongos del género Phytophthora en la presencia de fitoalexinas terpenoides tales como risitina, fituberina, anhidro-β-rotunol y solavetivona, experimentan granulaciones citoplasmáticas, ruptura de la membrana plasmática y vaciamiento del contenido celular (Harris y Dennis, 1976 y 1977), efectos que también han sido observados en células fúngicas tratadas con fitoalexinas isoflavonoides, tales como faseolina y keivitona (VanEtten y Bateman, 1971; VanEtten y Pueppke, 1976). Por otro lado, se ha reportado que algunos diterpenos con actividad antifúngica interactúan con la membrana plasmática de hongos, alterando su permeabilidad (Bouchra *et al.*, 2003; Cotoras *et al.*, 2004).

El mecanismo de acción de isotiocianatos y otros productos derivados de la hidrólisis de glucosinolatos no ha sido comprendido a cabalidad (Morrissey y Osbourn, 1999), sin embargo, se ha demostrado que algunos isotiocianatos afectarían en gran medida los procesos de diferenciación en hongos fitopatógenos, inhibiendo específicamente la formación de apresorios (Inyang *et al.*, 1999).

# 2.2.4 Actividad antifúngica de metabolitos secundarios de plantas en B. cinerea.

Los aceites esenciales de varias especies vegetales han sido evaluados para determinar su efectividad como controladores alternativos de *B. cinerea* (Shimoni *et al.* 1993; Arras *et al.* 1995; Carta *et al.* 1996; Antonov *et al.*, 1997; Soares *et al.*, 2003). En este contexto, Antonov *et al.* (1997) demostraron que los aceites esenciales de tomillo (*Thymus capitatus* L.), clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.) y árbol de menta (*Prostanthera rotundifolia*), redujeron significativamente la germinación de conidias y largo del tubo germinativo de este patógeno.

Los compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L. exhibieron actividad fungitóxica en este patógeno, reduciendo en hasta un 60% el crecimiento micelial, mientras la infección *in vivo* en frutos de frutilla (*Fragaria chilensis* L.) fue reducida en hasta un 70% cuando el hongo fue expuesto *in vitro* a concentraciones de 50 a 200 μg ml<sup>-1</sup> (Bhaskara *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha reportado que el crecimiento de *B. cinerea* fue completamente inhibido por los aceites esenciales de fresnillo (*Dictamnus albus* L.) y mejorana (*Oreganum syriacum* L.) en concentraciones relativamente bajas (85 a 300 μg ml<sup>-1</sup>) (Dafereraa *et al.*, 2003), y que la producción de esporas de este hongo fue reducida en mas de un 70% por el aceite esencial de hierba limón (*Cymbopogon citratus* Stapf.) en una concentración de 25 μg mg<sup>-1</sup>, mientas en la mayor concentración (500 μg mg<sup>-1</sup>), el proceso de esporulación fue completamente inhibido (Tzortzakis y Economakis, 2007).

Además, extractos crudos de una serie de plantas han sido evaluados por su efectividad en el control de *B. cinerea*, dentro de los cuales han mostrado ser activos los extractos de huamuchil (*Pithecellobium dulce* (Roxb). Benth.) (Bautista-Baños *et al.*, 2003), clavel del moro (*Tagetes patula* L.) (Mares *et al.*, 2004), canela (*Cinnamon cassia* L. Presl) (Lee *et al.*, 2007) y del árbol falsa secuoya (*Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu) (Bajpai *et al.*, 2007).

La actividad antifúngica en *B. cinerea* de varios metabolitos secundarios de plantas ha sido estudiada previamente. En este contexto, el crecimiento micelial *in vitro* de este patógeno fue inhibido por los siguientes metabolitos: la flavona sakuranetina, un flavonoide aislado desde la superficie de grosella negra (*Ribes nigrum* L.) (Atkinson y Blakeman, 1982); tres chalconas sintetizadas en la madera del árbol *B. manca* Standley (Grayer y Harborne, 1994); la saponina α-tomatina (Verhoeff y Liem, 1975; Quidde *et al.*, 1998); el triterpenoide tetracíclico cucurbitacina (Bar-Nun y Mayer, 1990); los diterpenos ácido kolavénico y 2-oxo-kolavénico, sintetizados en el árbol africano *Macaranga monandra* (L.) Muell. et Arg. (Salah *et al.*, 2003) y el ácido 3β-hidroxikaurenóico, aislado de extractos de plantas del género Pseudognaphalium (Cotoras *et al.*, 2001 y 2004); el terpinoleno, constituyente monoterpénico de aceites esenciales de varias especies de pinos y abetos; el ácido wyrona y su metil éster wyrona, sintetizado en cotiledones de haba (Buzi *et al.*, 2003); y los sesquiterpenos ginsenol, cedrol y lobulol (Aleu *et al.*, 2001).

Además, se ha demostrado que el estilbeno resveratrol ejerce efectos inhibitorios en la germinación de conidias de *B. cinerea* al ser utilizado en concentraciones desde 60 μg ml<sup>-1</sup> (25% de inhibición), siendo la dosis efectiva media (ED<sub>50</sub>) de 90 μg ml<sup>-1</sup> (Adrian *et al.*, 1997), y que cepas del patógeno, capaces de degradar este metabolito serían más patogénicas que aquellas que no presentan esta habilidad (Sbaghi *et al.*, 1996; Adrian *et al.*, 1998). Por otro lado, los pteroestilbenos inhiben la germinación de conidias de este hongo y han mostrado ser 5 veces más activos que resveratrol (Pezet y Pont, 1990; Adrian *et al.*, 1997). De acuerdo a Langcake (1981), ε-viniferina también exhibe actividad antifúngica en la germinación de conidias de *B. cinerea*, siendo ésta muy similar a la de los pteroestilbenos (Jeandet *et al.*, 2002).

En los que refiere a los fungicidas botánicos que han sido desarrollados comercialmente para el control de botritis, se puede destacar lo siguiente. En el año 2000, KHH BioScience Inc. (USA) registró el producto Milsana Bioprotectant Concentrate, formulado en base a un extracto etanólico de Reynoutria sachalinensis (F. Schmidt) Nakai, el cual reduce la infección por botritis en viñas (Schmitt et al., 2002; Schilder et al., 2002; Elmer y Reglinski, 2006). Por otra parte, la carvona, un monoterpeno asilado del aceite esencial de Carum carvi L., ha sido introducido comercialmente (nombre comercial: TALENT) en Holanda y ha mostrado ser efectivo en la protección de túberos de papa a diferentes tipos de pudriciones fúngicas durante el almacenamiento (Hartmans et al., 1995; Oosterhaven, 1995; Tripathi y Dubey, 2004). La azadirachtina, un tetraterpenoide característico de la familia Meliaceae, aislado principalmente del árbol Neem (Azadirachta indica A. Juss) (Mordue y Blackwell, 1993; Silva, 2002), es el biopesticida que ha recibido mayor atención en las dos últimas décadas (Satdive et al., 2007). Si bien este producto es utilizado principalmente como insecticida, ha mostrado ser activo en B. cinerea. Hoy en día se pueden encontrar formulaciones comerciales de Neem (Neem Gold, Neemazal, Econeem, Neemark, Neemcure y Azatin), en países como Estados Unidos, India, Alemania y varios países de América Latina (Salinas, 2002).

En Chile, se utilizan actualmente al menos dos fungicidas elaborados a partir de plantas para el control de *B. cinerea*: BC 1000, formulado en base a extractos de pulpa y semillas de pomelo, cuyo distribuidor exclusivo es MARTINEZ Y VALDIVIESO LTDA.; y STATUS*sulfo*,

preparado a partir de una mezcla de extractos de cítricos (ANASAC, Chile) (Fuente: información obtenida en el curso "Control biológico e integrado de enfermedades y nematodos en frutales y hortalizas", organizado por el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, 22-23 de Julio de 2004).

# 2.3 Antecedentes de Quillaja saponaria Molina

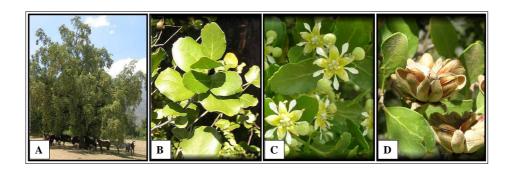
# 2.3.1 Etimología y clasificación taxonómica

La etimología del género Quillaja proviene de la denominación popular que se le da a este árbol en Chile ("quillay"), la cual a su vez deriva del Mapudungun "kullay", que significa "jabón de palo". Por otro lado, el nombre de la especie proviene del latín sapo (jabón) y hace referencia al alto contenido de saponinas en la corteza del árbol, metabolitos que se caracterizan por sus propiedades espumantes (Hoffmann, 1998).

El género quillaja, el cual cuenta con sólo tres especies sudamericanas, pertenece a la Clase Magnoliopsida, Subclase Rosidae, Orden Rosales, Familia Rosaceae, Subfamilia Spiroidea (Donoso y Cabello, 1978; Ibáñez, 1981; Montenegro, 2002)

# 2.3.2 Descripción botánica

El quillay, fanerófita siempreverde de hojas esclerófilas, es un árbol que suele alcanzar hasta 15 m de altura y diámetros de hasta 1 m. Su corteza es de color gris ceniciento y presenta fisuras longitudinales. Sus hojas son simples, alternas, cortamente pecioladas, coriáceas, de color verde claro amarillento, glabras, de forma oblonga y borde liso o sólo con algunos dientes. Sus flores son hermafroditas, solitarias o dispuestas en corimbos terminales cortos, de color verde blanquecino, aplanadas y en forma estrellada. Posee un cáliz compuesto por 5 sépalos y una corola de 5 pétalos alternos a los sépalos. Androceo formado por 10 estambres en dos series de filamentos libres y Gineceo compuesto por 5 ovarios, cada uno con un estilo filiforme y un estigma (Hoffmann, 1998). Su fruto es una cápsula leñosa, dehiscente, con forma de estrella de 5 puntas, que contiene numerosas semillas aladas (Donoso y Cabello, 1978; Hoffmann *et al*, 1992; Montenegro, 2002) (ver Figura 6).



**Figura 6.** *Quillaja saponaria* Mol. A) Árbol adulto, B) Follaje, C) Flores y D) Frutos. Fotografías de Juan Pablo Gabella y Diego Alarcón; http://www.chilebosque.cl/tree/qsapo.html.

# 2.3.3 Distribución geográfica y hábitat

El quillay es una especie endémica de Chile, especialmente dominante en la Zona Central del país, que se distribuye desde la Provincia de Limarí en la IV Región (30°30' LS.) hasta la Provincia del Bío-Bío en la VIII Región (38° LS.), formando parte del Matorral Esclerófilo desde la Cordillera de Costa hasta la Cordillera de los Andes (Rodríguez *et al.*, 1983; Hoffmann *et al.*, 1992; Montenegro 2002). De acuerdo a Lara (1997), este árbol crece en Chile desde Coquimbo a Malleco (IV a IX región), mientras su cultivo se concentraría en Valparaíso (V Región) y la Región Metropolitana (Hoffmann *et al.*, 1992). Hoffmann (1998), señala que el quillay es una especie frecuente en los Tipos Forestales Esclerófilo, Palma Chilena, Roble-Hualo y Ciprés de la Cordillera. De acuerdo a Leung (1980), además es posible encontrar ejemplares de quillay creciendo en forma natural en China, Perú y Bolivia.

En lo que refiere a su hábitat, esta especie se caracteriza por tolerar altas fluctuaciones térmicas y condiciones extremas de sequía (Hoffmann *et al.*, 1992). En este contexto, la especie se adapta fundamentalmente a climas secos y cálidos, sin embargo también se le encuentra en sitios más frescos y húmedos, soportando incluso la nieve y heladas de gran magnitud, en climas que van desde el Mediterráneo Árido (~200 mm de precipitación) hasta el Mediterráneo Húmedo (~1500 mm de precipitación), tanto en las laderas de exposición ecuatorial como en las de exposición polar (Ruiz de Gamboa, 1986; Vita, 1990; Montenegro, 2002). Por otro lado, este árbol se establece en suelos pobres degradados y con pendiente, aunque su mayor desarrollo lo alcanza en suelos profundos (Hoffmann, 1998). La especie se

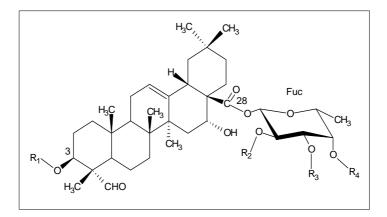
caracteriza por ser poco tolerante a la sombra y en la Cordillera es posible encontrarlo hasta cerca de los 2000 m de altura (Hoffmann *et al.*, 1992). En el Valle Central de Chile, crece en lugares asoleados y en los faldeos de los cerros más o menos secos y con escasa vegetación (Rodríguez *et al.*, 1983).

Cruz y Palma (1999), señalan que las formaciones vegetacionales en que participa quillay se encuentran distribuidas desde la zona norte de Ovalle hasta la zona norte de Angol, alcanzando una superficie de 1.475.842 hectáreas, las que representan aproximadamente el 2% del territorio nacional. Esta superficie corresponde mayoritariamente a praderas y matorrales (80%), y sólo un 19% a bosque nativo. Sin embargo, los autores destacar que en sólo un 16% (230.605 hectáreas) de ésta superficie total, quillay se encuentra como especie dominante.

## 2.3.4 Caracterización química

El quillay sintetiza una mezcla compleja de saponinas triterpénicas, siendo éstos los metabolitos mayoritarios en la especie (San Martín y Briones, 1999; Nord *et al.*, 2001). De hecho, la corteza de este árbol constituye actualmente una de las principales fuentes de saponinas triterpenoides en el mundo (van Setten y van der Werken, 1996; San Martín y Briones, 1999; Copaja *et al.*, 2003). En este contexto, en los extractos de corteza y madera de quillay se han identificado 62 saponinas diferentes (Higuchi *et al.*, 1987, Higuchi *et al.*, 1988; Kensil *et al.*, 1991; Jacobsen *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1998; Nord y Kenne, 1999 y 2000; Guo *et al.*, 2000; Guo y Kenne, 2000 a y b; Nyberg *et al.*, 2000; van Setten *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios utilizando HPLC combinado con espectrometría de masas y mapeo de monómeros (van Setten *et al.*, 1995; van Setten *et al.*, 1998), han mostrado la existencia de estructuras adicionales. Algunos componentes minoritarios permanecen en estudio, por lo que es probable que existan cientos de variantes estructurales (Nord *et al.*, 2001).

La estructura básica de las saponinas de quillay, es el triterpeno ácido quilláico sustituido en la posición C-3 con un trisacárido y en la posición C-28 con un oligosacárido a través de un residuo de fucosa, el cual a su vez, se encuentra unido a uno o dos grupos acil (Figura 7) (Higuchi *et al.* 1988; Kensil *et al.*, 1991; Jacobsen *et al.*, 1996; van Setten *et al.*, 1996; Nord y Kenne, 1999 y 2000).



**Figura 7.** Estructura básica de las saponinas de Q. saponaria Mol. La aglicona es el triterpeno ácido quilláico con ramificaciones de un trisacárido o disacárido unido en posición-3 ( $R^1$ ). El residuo fucosil (Fuc) unido al éster en la posición-28, es sustituido por un oligosacárido en la posición-2 ( $R^2$ ), por un residuo monosacárido o un grupo acil en la posición-3 ( $R^3$ ), y por un grupo acil en la posición-4 ( $R^4$ ). **Adoptado de:** Nord *et al.* (2001).

Además de saponinas, en extractos de quillay se han identificado algunos compuestos fenólicos, taninos, azúcares, proteínas y oxalato de calcio (Hoffmann *et al.*, 1992; San Martín y Briones, 2000).

## 2.3.5 Usos, propiedades e importancia económica

La importancia económica del quillay radica fundamentalmente en su alta concentración de saponinas, compuestos que presentan una gran cantidad de propiedades y usos (Ibáñez, 1981; Cruz *et al.*, 2000; San Martín, 2000).

De acuerdo a Hoffmann *et al.* (1992), en la etnomedicina esta especie se recomienda para tratar enfermedades respiratorias y afecciones cutáneas; como inyección vaginal para combatir hemorragias y la leucorrea; sus flores preparadas en forma de baños, para reumatismos crónicos; como infusión, para frotar extremidades y zonas enfermas; su corteza macerada, como expectorante; la infusión de su corteza, para afecciones escamosas y crónicas de la piel, en lavados hace desaparecer las indigestiones. Además el quillay se utiliza para tratar las alopesias, como estimulante de la mucosa gástrica, sudorífico y diurético.

Algunos de los principales usos tradicionales del quillay en Chile, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales usos tradicionales del quillay en Chile

Usos tradicionales	Descripción	
Combustible	Fabricación de leña y carbón.	
Artesanía y utilitarios	Confección de estribos, tallados, bateas y otros utensilios	
	artesanales.	
Detergente y champú	Elaboración casera de detergente y de champú.	
Producción apícola	Producción de néctar, "miel de quillay"	
Producción silvopastoral	Protección del ganado, resguardo en situaciones de	
	condiciones climáticas adversas.	
Paisajístico y ornamental	Ornamentación, por su follaje, verde-amarillento y	
	brillante, además de sus flores blanquecinas.	
Producción de hojarasca	Obtención de tierra de hoja.	

Adoptado de: Ibáñez (1981); Benedetti et al., (2000).

San Martín y Briones (1999), señalan que existen alrededor de 200 referencias científicas con respecto a las posibles aplicaciones industriales de las saponinas de quillay.

Las fracciones menos tóxicas de las saponinas de esta especie se han utilizado en el control y prevención de enfermedades infecciosas, cáncer, desórdenes autoinmunes, tratamiento del SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) e infección neumococal, control de la malaria y tratamiento de la tuberculosis (Kensil *et al.* 1991; Cainelli *et al.*, 1995; Newman, 1992; Wu, 1992; Chavali y Campbell, 1987 a y b; Prehn *et al.*, 2003).

Por ora parte, se ha reportado que las saponinas de quillay son capaces de actuar como antioxidantes (Hisayuki y Takashi 1987; Kooryama y Chiba, 1996). Sin embargo, las principales aplicaciones de las saponinas de este árbol, se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Principales aplicaciones industriales de las saponinas de quillay

<b>Aplicaciones Industriales</b>	Usos	
Alimentación humana	Agente espumante de cervezas y bebidas; emulsificante en	
	comida y bebidas; producción de alimentos con bajo colesterol.	
Alimentación Animal	Aditivos para alimentos; protección contra patógenos	
	(inmunoestimulantes); reducción de emisiones de amoníaco en	
	criaderos; reducción de colesterol en huevos y productos lácteos.	
Agrícolas	Promotor del crecimiento vegetal.	
Cosmética	Surfactante, emulsificante y compuesto activo,	
	fundamentalmente en la elaboración de champúes.	
Detergentes	Compuesto activo.	
Fotografía	Sufractantes en películas fotográficas.	
Minería	Tratamiento de aguas residuales; mejora calidad de los efluentes	
	orgánicos (biodegradación de grasas en procesos aeróbicos	
	y anaeróbicos); control de la neblina ácida en procesos de	
	electro obtención.	
Industria Farmacéutica	Adyuvante en vacunas humanas y animales; aplicaciones	
	farmacéuticas misceláneas.	

Adoptado de: San Martín y Briones (1999); Duery (2003); Natural Response (2004).

Además, estudios han demostrado que extractos de quillay ricos en saponinas actuarían como larvicidas (Pelah *et al.*, 2002), nematicidas (San Martín y Briones, 1999) y fungicidas (Villegas *et al.*, 1999; Apablaza *et al.*, 2002; Moya, 2003; Chapagain *et al.*, 2007) naturales. De hecho, actualmente se está evaluando la posibilidad de utilizar dichos extractos en la formulación de pesticidas naturales de interés comercial (Apablaza *et al.*, 2002; Chapagain *et al.*, 2007).

## 2.3.6 Estado de conservación

La explotación a través de prácticas de manejo inadecuada de poblaciones naturales de quillay en Chile, el bajo nivel de reproducción por semillas y el progresivo reemplazo de los bosques por cultivos, han amenazado seriamente la preservación de esta especie. Por otro lado, la alta

demanda por corteza de quillay para la obtención y comercialización de saponinas, ha disminuido notablemente la existencia de árboles adultos (Copaja *et al.*, 2003). Debido a ésto, con el propósito de proteger la población de la especie, en 1985 el quillay fue clasificado en estado "*Vulnerable*" por la Corporación Nacional Forestal en la IV Región (CONAF, 1989).

La totalidad de las saponinas de quillay que se comercializan en el mundo, provienen de la corteza exportada desde Chile (Toral, 1983; Rosende, 1990). De esta forma, cada año se cosechan 60.000 árboles de 30-50 años y se extraen 1000 toneladas de corteza, las cuales se exportan a EE.UU., Europa y Japón. Considerando que la corteza representa sólo el 11% del árbol (Toraland y Rosende, 1986; Prado *et al.* 1987), cada año se pierden o se utilizan parcialmente para la producción de carbón, 20.000 toneladas de biomasa (Copaja *et al.*, 2003), por lo que este tipo de extracción, ha originado una subutilización del recurso desde el punto de vista económico (Cruz, 2000). En respuesta a ésto, la empresa Natural Response S.A. ha logrado desarrollar un proceso que utiliza toda la madera del quillay (no sólo la corteza) para la obtención de extractos de quillay ricos en saponinas, lo que ha permitido satisfacer parte de la demanda mundial de saponinas empleando madera proveniente de raleos de los bosques existentes (Natural Response, 2004).

Por otra parte, en nuestro país actualmente se están desarrollando proyectos silvícolas y de manejo forestal para el quillay, respaldados por un programa de propagación, cuyo objetivo es obtener la producción masiva, eficiente y económica de árboles con un alto contenido de saponinas de buena calidad y baja toxicidad (Prehn *et al.*, 2003).

## 2.4 Cultivo *in vitro* de especies vegetales

# 2.4.1 Definición

Pierik (1987), define al cultivo *in vitro* de plantas superiores, como el cultivo en medio nutritivo, bajo condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas (Pierik, 1990).

En sentido estricto, *in vitro* quiere decir "dentro de vidrio", por lo que este sistema de cultivo además se ha definido como el cultivo de plantas, o de alguna de sus partes, dentro de recipientes de vidrio (Dixon, 1991; Smith, 1992; Gamborg y Phillips, 1995). De acuerdo a ésto, en una definición mas completa, el cultivo *in vitro* de plantas es una técnica biotecnológica que generalmente se utiliza para propagar en poco tiempo y en condiciones estériles, una gran cantidad de plantas genéticamente iguales a partir de un pequeño segmento inicial de tejido (denominado explante), el cual se desarrolla dentro de un recipiente de vidrio, empleando un sustrato artificial y controlando estrictamente las condiciones ambientales, hormonales y de nutrición requeridas por la planta (Bhojawani y Razdab, 1996; Gamborg, 2002). En la Figura 8, se muestra algunos ejemplos de explantes cultivados en condiciones *in vitro*.



**Figura 8.** Ejemplos de explantes vegetales cultivados *in vitro*. **Adoptado de:** Boletín Ciencia y Tecnología, Nº 24, Mayo 2004, y www.bonsai-flora.es/invitro.htm.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se basa en el concepto de "totipotencia celular" (Dixon, 1991; Smith, 1992; Vsil y Torpe, 1994; Gamborg y Phillips, 1995; Gamborg, 2002), término que se refiere a que todas las células de una planta, bajo condiciones adecuadas y estímulos apropiados, tienen la capacidad de regular la división y diferenciación celular para crecer y regenerar una nueva planta, genéticamente idéntica a la planta madre (Taiz y Seiger, 1998; Lambers *et al.*, 2000)

#### 2.4.2 Condiciones de cultivo

El cultivo *in vitro* de plantas exige reproducir, de la forma más aproximada posible, todos aquellos factores que puedan incidir en el crecimiento de las plantas en la naturaleza (Smith, 1992; Vsil y Torpe, 1994; Gamborg y Phillips, 1995). Sin embargo, igualar en condiciones de

laboratorio todos los factores que conforman el biotopo de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo, razón por la cual, se consideran sólo aquellos factores que se puedan mantener controlados más fácilmente (Vsil y Torpe, 1994; Bhojawani y Razdab, 1996; Gamborg, 2002)

Antes de extraer los explantes se debe realizar una desinfección de los fragmentos para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado, el material vegetal se debe mantener en condiciones de asepsia durante todo el proceso de cultivo, para lo cual se trabaja en cámaras de flujo laminar (Smith, 1992; Vsil y Torpe, 1994; Bhojawani y Razdab, 1996; Gamborg, 2002)

El ambiente químico de las plantas cultivadas *in vitro* está determinado por la composición del medio de cultivo, entendiendo por éste la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua, el cual además debe contener los siguientes componentes básicos: elementos esenciales o iones minerales, suplementados como una mezcla compleja de sales (solución stock); un suplemento orgánico que aporte vitaminas y/o aminoácidos; una fuente de carbono; reguladores de crecimiento (hormonas); y un agente gelificante, en el caso de que el medio se utilice en estado sólido (Vsil y Torpe, 1994; Bhojawani y Razdab, 1996; Gamborg, 2002). Por otro lado, el pH del medio de cultivo debe ser ajustado de acuerdo a los requerimientos de la especie vegetal en cultivo (Smith, 1992; Bhojawani y Razdab, 1996; Gamborg, 2002)

Es de especial importancia añadir una fuente de carbono al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) cuando se desarrollan en condiciones de cultivo *in vitro* no son completamente autotróficas (Vsil y Torpe, 1994; Gamborg y Phillips, 1995; Bhojawani y Razdab, 1996; Gamborg, 2002). Por otra parte, se ha documentado ampliamente que el índice auxina/citoquininas en el medio de cultivo determina el tipo de cultivo establecido o regenerado. En este contexto: un alto nivel de auxinas con respecto al de citoquininas, favorece la formación de raíces; un alto nivel de citoquininas con respecto al de auxinas, induce la producción de brotes; mientras un índice intermedio favorece la formación de grupos de células sin diferenciación (Smith, 1992; Vsil y Torpe, 1994; Gamborg y Phillips, 1995)

El cultivo *in vitro* de plantas se desarrolla dentro de espacios denominados cámaras de crecimiento (o cultivo) (Figura 9), los cuales están diseñados para permitir el control del ambiente físico del cultivo (Vsil y Torpe, 1994; Gamborg y Phillips, 1995)



**Figura 9.** Cámaras de crecimiento utilizadas para la incubación de plantas cultivadas *in vitro*. **Adoptado de:** www.unizar.es/Micropropa/Micvegetal.htm

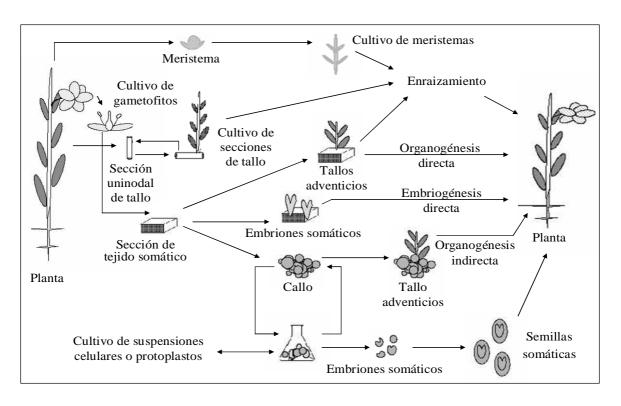
Dentro de los factores físicos, la temperatura a la que están expuestos los cultivos es un factor fundamental a controlar. En general, cada especie presenta un intervalo de temperaturas óptimo, sin embargo, para la mayoría de las plantas se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas en el rango de los 20 y 28° C (Smith, 1992; Vsil y Torpe, 1994; Bhojawani y Razdab, 1996). Otro factor importante es el número de horas de luz diarias que recibe el cultivo, lo que se conoce como fotoperíodo (Taiz y Seiger, 1998; Lambers *et al.*, 2000). En este contexto, se ha reportado que el mejor fotoperíodo para una especie cultivada *in vivo*, será también el mejor para la planta cultivada *in vitro* (Vsil y Torpe, 1994; Bhojawani y Razdab, 1996; Gamborg, 2002)

# 2.4.3 Tipos de cultivo

Como se ha destacado, el material vegetal con el que se inicia un cultivo *in vitro* puede ser cualquier célula, fragmento de tejido u órgano (Pierik, 1990; Dixon, 1991; Gamborg, 2002), sin embargo, se ha reportado que por lo general tejido joven en crecimiento activo (o tejido en un estado temprano de desarrollo), es el explante más efectivo (Smith, 1992; Vsil y Torpe, 1994; Gamborg y Phillips, 1995; Bhojawani y Razdab, 1996).

Los explantes, al ser cultivados en un medio de cultivo apropiado, usualmente en presencia de auxinas y citoquininas, pueden dar lugar a una masa de células desorganizada en división, lo que se conoce como callo (Vsil y Torpe, 1994; Dodds y Roberts, 1995). Cuando callos friables son dispuestos en un medio de cultivo líquido en agitación, células simples (y/o grupos pequeños de células) son liberadas dentro del medio, las cuales continúan creciendo y se dividen, dando lugar a suspensiones celulares (Ochoa-Alejo, 1990; Vsil y Torpe, 1994; Bhojawani y Razdab, 1996; Gamborg, 2002). El cultivo in vitro de protoplastos, entendiendo por éstos células a las cuales se les ha removido la pared celular (Taiz y Seiger, 1998; Lambers et al., 2000), puede ser obtenido a partir de células del mesófilo o desde suspensiones celulares (Smith, 1992; Vsil y Torpe, 1994; Bhojawani y Razdab, 1996; Gamborg, 2002). Además, tanto ápices radicales, obtenidos desde la raíz primaria o desde las raíces laterales, como ápices foliares, desde yemas axilares o adventicias, pueden ser cultivados in vitro (Pierik, 1990; Smith, 1992; Vsil y Torpe, 1994; Bhojawani y Razdab, 1996). Finalmente, embriones, ya sea maduros o inmaduros, (Pierik, 1990; Gamborg y Phillips, 1995; Bhojawani y Razdab, 1996; Gamborg, 2002) y polen (Pierik, 1990; Dixon, 1991; Vsil y Torpe, 1994; Gamborg y Phillips, 1995), también se han utilizado como explantes.

La regeneración de plantas completas, a partir de los diferentes tipos de cultivos *in vitro*, puede ocurrir a través de embriogénesis somática u organogénesis (George y Sherrington, 1984; Walden y Wingender, 1995; Sugiyama, 1999; Ramage y Williams, 2002). La primera se basa en la regeneración de plantas a través de un proceso análogo a la germinación de un embrión cigótico. De acuerdo a ésto, en el explante se producen estructuras bipolares que presentan las propiedades morfológicas de los embriones cigóticos, y según que éstos surjan directamente del explante o bien de un callo, se hablará de embriogénesis directa o indirecta, respectivamente (George y Sherrington, 1984; Walden y Wingender, 1995). Por otro lado, la organogénesis se basa en la regeneración de plantas mediante la producción directa de órganos, y al igual que la embriogénesis somática, sí ésta se produce directamente del explante o desde un callo, se hablará de organogénesis directa o indirecta, respectivamente (George y Sherrington, 1984; Sugiyama, 1999). En la Figura 10, se muestra un resumen de los diferentes tipos de cultivos *in vitro* y las vías en la que éstos pueden dar lugar a una planta completa.



**Figura 10.** Tipos de cultivos *in vitro*. **Adoptado y modificado de:** Lindsey y Jones, 1989.

# 2.4.5 Aplicaciones

El enorme potencial del cultivo *in vitro* de plantas para la producción masiva de plantas de interés comercial, ha provocado que en los últimos 25 años se haya incrementado el número de laboratorios de cultivo de tejidos en el país y en el mundo, lo cual ha motivado que algunos agricultores la estén utilizando como una alternativa efectiva en sus programas de producción (Bhojawani, 1990; Roca y Mroginski, 1991; Sajc *et al.*, 2000)

Además de su aplicación en la propagación de plantas a gran escala, la técnica de cultivo *in vitro* de plantas es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos (principalmente virus), la producción y mantención de especies vegetales en peligro de extinción, y en estudios de ingeniería genética (Teutonico y Knorr, 1984; Bhojawani, 1990; Roca y Mroginski, 1991; Sajc *et al.*, 2000)

Por otra parte, varios estudios han demostrado que tejido vegetal proveniente de cultivo *in vitro* es capaz de producir compuestos específicos en concentraciones similares que plantas

intactas en condiciones *in vivo* (Calva-Calva *et al.*, 2002; Vanisree *et al.*, 2004). Así, los considerables avances de la última década en el área de la biotecnología vegetal, han dado la oportunidad de que las plantas puedan considerarse como verdaderos biorreactores para la producción de metabolitos secundarios (Calva-Calva *et al.*, 2002; Vanisree *et al.*, 2004). La producción biotecnológica de metabolitos secundarios obtenidos a través de cultivo *in vitro* de plantas puede ser optimizada a través del uso de diferentes técnicas, entre las cuales destacan, la selección de líneas que se caractericen por presentar altos niveles de síntesis, la optimización del medio de cultivo, la regulación de algunos parámetros ambientales (Fowler, 1986; Vanisree *et al.*, 2004), y el uso de elicitores, tanto bióticos como abióticos (DiCosmo y Misawa, 1985; Dörnenburg y Knorr, 1995; Bais *et al.*, 2002; Soylu *et al.*, 2002; Vanisree *et al.*, 2004)

# 3 MATERIALES Y MÉTODOS

# 3.1 Cultivo y propagación in vitro del material vegetal

Para el cultivo y propagación *in vitro* de la especie en estudio se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog), cuya composición se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog.

Componentes	Concentración (mg l <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
$CaCl_2$	332,2
${ m MgSO_4}$	180,7
$KNO_3$	1900
$KH_2PO_4$	170
$H_3BO_3$	6,2
$MnSO_4$	16,9
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6
CoSO <sub>4</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO4 x 2H <sub>2</sub> O	0,25
KI	0,83
Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,26
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8
Glicina	2
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina-HCl	0,5
Tiamina-HCl	0,1

Adoptado de: Murashige y Skoog, 1962.

Para iniciar el cultivo *in vitro*, se utilizó como explantes yemas axilares de plantas de quillay de 1 año en condiciones naturales de crecimiento, adquiridas en el vivero de la Universidad de Chile (Santiago-Chile). Las yemas fueron esterilizadas en una solución de hipoclorito de sodio (20% v/v) por 10 min en agitación, enjuagadas en agua destilada estéril y luego dispuestas en medio de cultivo MS sólido.

El medio de cultivo fue suplementado con BAP [6-bencil amino purina (0,3 mg l<sup>-1</sup>)], cinetina (0,3 mg l<sup>-1</sup>) y biotina (0,1 mg l<sup>-1</sup>). Como fuente de carbono se utilizó sacarosa (20 g l<sup>-1</sup>) y como agente gelificante agar nacional Midesa (8 g l<sup>-1</sup>). El pH se ajustó a 5,7 empleando hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl).

Para iniciar el proceso de inducción de brotes, los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a una temperatura de incubación constante de  $21 \pm 2^{\circ}$  C, bajo tubos fluorescentes, a una intensidad de luz de 65 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y un fotoperíodo de 16 horas luz (Pulgar, 1998). Como explantes de micropropagación se utilizaron brotes laterales de 2 a 3 entrenudos de plantas pre-cultivas *in vitro* durante 1 mes a partir de las yemas axilares iniciales. Los procesos de esterilización y siembra de explantes se realizaron en una cámara de flujo laminar en condiciones asépticas

# 3.2 Inóculos y condiciones de cultivo de B. cinerea.

En este estudio se utilizó el aislado U-29 de *B. cinerea*, obtenido de bayas naturalmente infectadas de vid (*V. vinifera* L.) (Muñoz *et al.*, 2002), el que fue proporcionado por el Instituto de Investigación Agropecuarias (INIA)-La Platina, Chile.

## 3.2.1 Medios de cultivo

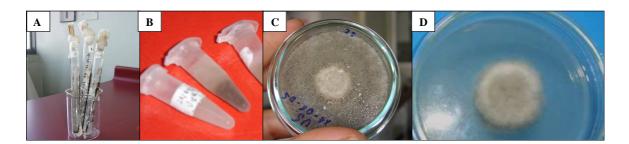
Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes: agar extracto malta levadura sólido (agar 1,5% p/v; extracto malta 2% p/v; extracto levadura 0,2% p/v); agar extracto malta levadura blando (agar 0,6% p/v; extracto malta 2% p/v; extracto levadura 0,2% p/v); extracto malta-levadura líquido (extracto malta 2% p/v; extracto levadura 0,2% p/v); medio MS (pH

6,0); y medio de cultivo mínimo líquido [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g l<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g l<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (0,5 g l<sup>-1</sup>), KCl (0,5 g l<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (0,01 g l<sup>-1</sup>), tartrato de amonio (25 mM). El pH fue ajustado a 6,5] (Cotoras *et al.*, 2004).

## 3.2.2 Obtención de inóculos

Previo a la utilización del asilado se obtuvieron cultivos monoconidiales del patógeno (Hansen y Smith, 1932). El hongo fue mantenido como micelio en tubos inclinados que contenían medio de cultivo agar extracto malta-levadura sólido (Figura 11A), a 4° C en oscuridad, o bien como suspensión de conidias en glicerol (150 μl de glicerol por cada 750 μl de suspensión) (Figura 11B), a -20° C en oscuridad.

Las suspensiones conidiales fueron obtenidas reflotando, en medio de cultivo MS líquido (pH 6,0), cultivos de 10 a 15 días de incubación (22° C en oscuridad) (Figura 11C). Antes de su utilización, las suspensiones fueron filtradas en lana de vidrio y las concentraciones deseadas (10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> conidias ml<sup>-1</sup>) se ajustaron empleando una cámara de Neubauer de 0,0025 mm<sup>2</sup> (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2003). Para la obtención de micelio (Figura 11D) como inóculo, placas Petri que contenían agar extracto malta-levadura sólido, fueron inoculadas en el centro con una alícuota de 30 μl de una suspensión de conidias del hongo (1 x 10<sup>6</sup> conidias ml<sup>-1</sup>) y los cultivos fueron incubados a 22° C, en oscuridad durante 72 horas (Cotoras *et al.*, 2001). Cultivos obtenidos mediante esta misma metodología, incubados por un mayor lapso de tiempo, se utilizaron para la obtención de las suspensiones conidiales.



**Figura 11.** Aislado U29 de *B. cinerea*. (A) Micelio en tubos inclinados, (B) Esporas en glicerol, (C) Cultivos esporulados de 10-15 días de incubación y (D) Micelio en crecimiento activo (72 horas de incubación).

## 3.3 Preparación de extractos vegetales

Para la obtención de los extractos vegetales se utilizaron brotes frescos de quillay cultivado *in vitro*, y para aquellos de plantas en condiciones naturales de crecimiento (condiciones *in vivo*), se emplearon hojas nuevas (tejido fresco) de ejemplares adultos (Parque Mahuida, Precordillera, Región Metropolitana, Chile). Los extractos de brotes *in vitro*, fueron preparados sumergiendo 5, 10 y 15 g de tejido en 100 ml de solvente (5, 10 o 15% p/v), mientras los extractos de plantas de quillay *in vivo*, se prepararon sólo en concentración de 10% p/v.

Los extractos fueron preparados mediante las técnicas de maceración y difusión. En la primera, el tejido fue triturado en nitrógeno líquido empleando maja y mortero de cerámica, previo a la extracción acuosa o hidroalcohólica (etanol 85% v/v) en frío, durante 15 min en oscuridad. Para la extracción por difusión, el material vegetal, seccionado en pequeños trozos, se mantuvo en contacto con el solvente en frío (4° C), durante 24 horas en oscuridad. Antes de su utilización, los extractos fueron filtrados y homogeneizados por agitación (Inderjit y Dakshini, 1995; Heisey, 1996). Adicionalmente, para determinar la Dosis Efectiva Media (DE<sub>50</sub>), el extracto etanólico fue reducido a sequedad a 40° C en un rotavapor.

# 3.4 Actividad antifúngica in vitro en B. cinerea de extractos de quillay in vitro

Se evaluó el efecto de extractos de brotes *in vitro* de quillay en el crecimiento micelial *in vitro* y la germinación de conidias de *B. cinerea*. En cada ensayo se realizaron 6 repeticiones por tratamiento y 3 experimentos independientes.

#### 3.4.1 Crecimiento micelial in vitro

Se estudió el efecto de los extractos en el crecimiento radial de micelio utilizando el método de dilución en medio sólido, empleando como sustrato agar extracto malta-levadura blando, de acuerdo a lo realizado Cotoras *et al.* (2004), con algunas modificaciones. En base a ésto, se adicionaron alícuotas de los extractos en concentraciones de 5, 10 y 15% p/v o el solvente

como control, en proporción 1:10 al medio de medio de cultivo, antes de la gelificación del medio de cultivo. De esta forma, los extractos fueron evaluados en concentraciones finales de 0,5; 1,0 y 1,5% p/v. La concentración final de solvente fue idéntica en el control y los tratamientos. El medio de cultivo, con o sin los extractos, fue vertido en placas Petri de 9 cm de diámetro. Las placas fueron ubicadas en una cámara de flujo laminar por 30 min para la evaporación del solvente y luego fueron inoculadas con discos de 0,5 cm de micelio fino de *B. cinerea* de 72 horas de crecimiento, los cuales fueron dispuestos en el centro de la placa en forma invertida. Los cultivos fueron incubados a 22° C en oscuridad. El diámetro de micelio fue medido diariamente con una regla. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición mediante la fórmula [(C-T)/C \* 100], donde C y T correspondieron a la extensión hifal (cm) en los cultivos control y tratados, respectivamente.

## 3.4.2 Germinación de conidias

El ensayo fue realizado en portaobjetos de microscopio de acuerdo al método utilizado por Cotoras et al. (2001) modificado, para lo cual se depositaron sobre un portaobjeto 5 ml de medio de cultivo agar extracto malta-levadura blando suplementado con el extracto etanólico de brotes in vitro de quillay, en concentraciones finales de 0,5; 1,0 y 1,5% p/v o el solvente como control. Luego de la evaporación del solvente y gelificación del medio de cultivo, los portaobjetos fueron inoculados con conidias secas, untado delicadamente sobre el medio de cultivo un trozo de agar extraído desde un cultivo esporulado de 10 días de incubación (22º C en oscuridad). Luego de la inoculación, los portaobjetos fueron dispuestos dentro de cámaras húmedas e incubados a 22° C durante 11 horas. La germinación de conidias fue determinada directamente en los portaobjetos a intervalos de horas observando las muestras en un Microscopio Óptico. Se consideraron germinadas únicamente las conidias con un tubo germinativo igual o superior al diámetro conidial (Inyang et al., 1999). Los resultados fueron expresados como porcentage de conidias germinadas mediante la fórmula [(T\*(100)/C], donde C y T correspondieron al número de conidias germinadas en los cultivos control y tratados, respectivamente. El valor promedio de 5 campos por unidad experimental fue utilizado para los cálculos. Adicionalmente, se analizó el efecto de los extractos en la morfología fúngica.

# 3.4.3 Determinación de la dosis efectiva media ( $DE_{50}$ )

Para determinar la  $DE_{50}$ , el extracto etanólico de brotes cultivados *in vitro* de quillay fue rotoevaporado a sequedad y se evaluó la actividad antifúngica en *B. cinerea* de soluciones hidroalcohólicas (etanol 85% v/v) del extracto en concentraciones finales de 50, 100, 250, 500 y 1000  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, utilizando la metodología de crecimiento radial de micelio en medio de cultivo agar extracto malta-levadura blando (Cotoras *et al.*, 2004; como se describe en *3.4.1*). Como control positivo se empleó el fungicida sintético comercial Rovral (iprodione-dicarboximida), en una concentración final de 250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>.

## 3.4.4 Actividad antifúngica de extractos de quillay in vitro & quillay in vivo

Para comparar la actividad antifúngica de extractos de brotes *in vitro* con la de aquellos de hojas de quillay *in vivo* (condiciones naturales de crecimiento), se evaluó el efecto de los extractos en el crecimiento radial de micelio de *B. cinerea*, utilizando el método de dilución en medio sólido, empleando como sustrato agar extracto malta-levadura blando (Cotoras *et al.* 2004; como se describe en *3.4.1*). Se adicionaron alícuotas de ambos tipos de extractos (quillay *in vitro* e *in vivo*), tanto acuosos como etanólicos (etanol 85% v/v) en concentración de 10% p/v (o el solvente como control), en proporción 1:10 al medio de medio de cultivo antes de la gelificación. De acuerdo a ésto, los extractos fueron evaluados en concentraciones finales de 1,0% p/v.

# 3.5 Actividad antifúngica in vivo en B. cinerea de extractos de quillay in vitro

El extracto etanólico (etanol 85% v/v) fue diluido 10 veces en agua destilada para descartar el efecto fungistático del solvente, y utilizado en una concentración cercana pero superior a la ED<sub>50</sub> de los mismos (según los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*). La concentración final de solvente fue idéntica en el control y los tratamientos. Como control positivo se empleó el fungicida comercial de origen vegetal BC1000. El valor promedio de 3 experimentos independientes fue empleado para los cálculos.

# 3.5.1 Habilidad de B. cinerea de colonizar hojas de tomate

Hojas cosechadas de tomate (*L. esculentum* Mill.) cv. Roma, fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio 10% v/v (10 min en agitación), lavadas tres veces con agua destilada estéril, ubicadas en papel absorbente para eliminar el exceso de agua y dispuestas en el centro de placas Petri conteniendo agar-agua (agar 1% p/v). Luego se aplicó en la superficie de las hojas con un pincel estéril, el extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay (250 μg ml<sup>-1</sup>), etanol 8,5% v/v (control negativo del extracto), el fungicida orgánico comercial BC-1000 en la dosis recomendada (control positivo del extracto) o agua destilada (control negativo de BC 1000). Las hojas tratadas, luego de la evaporación del solvente, fueron inoculadas en el centro con un disco de 0,5 cm de micelio fino de *B. cinerea* de 72 horas de crecimiento.

Las placas fueron selladas e incubadas a 22° C (Cotoras *et al.*, 2004). Luego de 5 días de incubación, se midió el área de la lesión con una regla. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento.

# 3.5.2 Desarrollo de infección por B. cinerea en frutos de frutilla

Frutos cosechados de frutilla (*F. chilensis* L.), de tamaño uniforme, libres de deterioro e infección, fueron desinfectados con hipoclorito de sodio 10% v/v, lavados tres veces con agua destilada estéril y dispuestos sobre papel absorbente para eliminar el exceso de agua. Luego, se realizó una herida de 0,5 cm en el centro de cada fruto con ayuda de un bisturí estéril. Los frutos fueron asperjados con soluciones del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay (250 μg ml<sup>-1</sup>), etanol 8,5% v/v (control negativo del extracto), el fungicida BC-1000 (control positivo del extracto) o agua destilada (control negativo BC 1000), e inoculados en la herida, luego de la evaporación del solvente, con 30 μl de una suspensión de conidias de 1 x 10<sup>6</sup> conidias ml<sup>-1</sup>.

Los frutos inoculados fueron incubados en una cámara húmeda a 22° C (Bhaskara *et al.*, 1988) y luego de 5 días de incubación, se determinó el porcentaje de área infectada en los frutos. Se realizaron 16 repeticiones por tratamiento.

# 3.6 Mecanismo de acción del extracto etanólico de quillay in vitro

Para dilucidar el posible mecanismo de acción del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay, se evaluó el efecto de éste en el consumo de oxígeno de conidias (respiración celular), en la integridad de la membrana plasmática, en el grado de estrés oxidativo y en la actividad de enzimas involucradas en el proceso de patogénesis de *B. cinerea*.

## 3.6.1 Consumo de oxígeno en conidias

El consumo de oxígeno se determinó polarográficamente con un Electrodo de Oxígeno (Electrodo Clark Nº 5331; Yellow Spring Instrument; OH; USA) y un Oxígrafo (Gilson 5/6). Las determinaciones se realizaron en una suspensión de conidias (1 x 10<sup>7</sup> conidias ml<sup>-1</sup>), de acuerdo al método empleado por Chitarra *et al.* (2005) modificado.

## 3.6.1.1 Obtención de la suspensión conidial

La suspensión conidial fue obtenida reflotando en medio de cultivo MS líquido (pH 6,0), cultivos incubados durante 10 días a 22° C en oscuridad. La suspensión fue filtrada a través de lana de vidrio, centrifugada por 6 min a 5000 g y el pellet fue resuspendido en medio de cultivo mínimo líquido (pH 6,5) suplementado con glucosa 2% p/v como fuente de carbono.

## 3.6.1.2 Determinación del consumo de oxígeno

La suspensión de conidias fue incubada a 22° C durante 2 horas, antes de realizar la determinación del consumo de oxígeno. En cada medición se utilizaron 300 μl de medio de cultivo mínimo suplementado con glucosa 2% p/v y 700 μl de la suspensión conidial. Se consideró como 100% de consumo de oxígeno, al número de moles de oxígeno consumido por min en la suspensión de conidias en ausencia de los tratamientos. El consumo de oxígeno se midió antes (CB) y después (CT) de aplicar una alícuota de 100 μl del extracto etanólico de quillay (o el solvente como control) Los resultados se expresaron como porcentaje de consumo aplicando la fórmula [(CT \* 100)/ CB]. Como controles positivos se utilizó cianuro de potasio (KCN) 10 mM, como inhibidor de la respiración, y carbamil cianuro-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) 10 μg ml<sup>-1</sup>, como desaclopador de la cadena respiratoria. El extracto fue evaluado en concentraciones finales de 100, 250, 500, y 1000 μg ml<sup>-1</sup>.

# 3.6.2 Integridad de la membrana citoplasmática

El efecto del extracto en la integridad de la membrana de *B. cinerea* se evaluó mediante dos metodologías, las cuales se describen a continuación.

# 3.6.2.1 Captación del colorante fluorogénico Sytox Green

En ensayo fue realizado de acuerdo a los método empleados por Theis et al. (2003) y Roth et al. (1997) con algunas modificaciones. De acuerdo a ésto, tubos de ensayo que contenían 5 ml de medio mínimo líquido suplementado con glucosa 1% p/v, fueron inoculados con una suspensión de conidias (1 x 10<sup>5</sup> conidias ml<sup>-1</sup>) de B. cinerea e incubados durante 15 horas a 22° C. Una vez cumplido el tiempo, la suspensión fue alicuotada en dosis de 1 ml en tubos eppendorf. Los tubos fueron centrifugados a 1677 g, durante 8 min. El pellet fue tratado con una solución metanólica (metanol 100%) del extracto etanólico (rotoevaporado a sequedad) de quillay (250 μg ml<sup>-1</sup>), metanol 10 %v/v (control negativo) o etanol 70 %v/v (control positivo), en medio mínimo líquido. Los cultivos fueron incubados por 4 horas [extracto y control (-)] o 10 min [control (+)] a 22° C y se centrifugaron a 1677 g durante 8 min. Luego, el pellet fue resuspendido en una solución de Sytox Green (colorante fluorogénico) 50 nM e incubado por 10 min a 22° C en agitación suave (90 rpm). Los cultivos fueron centrifugados a 1677 g durante 8 min y se agregó medio de cultivo mínimo para eliminar el exceso de la solución de tinción. Las muestras se centrifugaron una vez más a 1677 g durante 8 min y el sobrenadante fue eliminado aunque no completamente, rescatando 20 a 30 µl, alícuota que fue depositada sobre un portaobjeto. Las muestras fueron fijadas con 10 µl de DABCO [1,4-diazabiciclo (2.2.2) octano] y observadas mediante Microscopía Confocal. Hifas con núcleos fluorescentes indicaron ruptura de la membrana plasmática por efecto del tratamiento. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento y 3 experimentos independientes.

# 3.6.2.2 Concentración de Fósforo y Potasio en el medio de incubación

En ensayo fue realizado de acuerdo al método empleado por Cotoras *et al.* (2004), con algunas modificaciones. En base a ésto, se inocularon matraces de 125 ml que contenían 20 ml de medio extracto malta-levadura líquido, con una suspensión de conidias de 1 x 10<sup>5</sup> conidias ml<sup>-1</sup>, los cuales fueron incubados a 22° C en oscuridad. Luego, el micelio pre-crecido durante 48 horas fue cosechado e incubado, durante 6, 12 y 48 horas a 22° C en oscuridad, en Buffer Tris-

HCl 5 mM (pH 7,0) suplementado con el extracto etanólico de quillay en diferentes concentraciones (o el solvente como control) (Cotoras *et al.*, 2004). La concentración de fósforo (P) y potasio (K) (mg 1<sup>-1</sup>) en el medio de incubación, se determinó mediante Espectroscopía de Emisión Óptica Acoplada a Inducción por Plasma (ICP-OE) (Óptimo 200 DV ICP-OES, Perkin-Elmer).

# 3.6.3 Grado de estrés oxidativo

Para evaluar el efecto del extracto etanólico de quillay en parámetros de estrés oxidativo del patógeno, en este estudio se determinó los niveles de lipoperoxidación de membranas, contenido de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y actividad de enzimas antioxidantes en los cultivos tratados. Para realizar tales determinaciones, se inocularon matraces de 125 ml que contenían 20 ml de medio extracto malta-levadura líquido, con una suspensión de conidias hasta lograr una concentración final de 1 x 10<sup>6</sup> conidias ml<sup>-1</sup>, los cuales fueron incubados a 22° C en agitación (200 rpm) durante 48 horas. Luego de ese tiempo, el micelio fue cosechado por centrifugación e incubado en medio extracto malta-levadura líquido suplementado con el extracto en concentraciones finales de 100, 250 o 500 μg ml<sup>-1</sup> (o el solvente como control) durante 6 y 48 horas (De acuerdo a Choi *et al.*, 1997, modificado)

# 3.6.3.1 Lipoperoxidación de membranas

La lipoperoxidación de membranas fue estimada por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) basado en la producción malondialdehído (MDA), según el método utilizado por Steel *et al*. (1993) modificado (Choi, *et al.*, 1996). El micelio de los cultivos tratados, fue cosechado por centrifugación a 5000g por 10 min y pulverizado en frío en un mortero de cerámica usando nitrógeno líquido. Para la determinación de MDA, se suspendieron 0,5 g de la muestra en 1 ml de una solución de TBA 0,5% p/v en ácido tricloroacético (TCA) 20% v/v. La suspensión fue centrifugada a 20000g por 15 min y el sobrenadante fue colectado, calentado a baño maría por 25 min y puesto a enfriar en un baño de hielo. Luego, el sobrenadante fue filtrado y usado para la determinación espectrofotométrica de MDA, a una absorbancia de 532 nm y absorbancia no-específica de 600 nm. La concentración de MDA fue calculada utilizando un coeficiente de extinción molar de 156 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Se determinó además, el contenido de MDA en el medio de

incubación, considerando una proporción de 5/2 (v/v) de la alícuota del medio de cultivo con respecto a la solución de TBA 0,5% p/v en ácido tricloroacético (TCA) 20% v/v.

El contenido de proteínas en las muestras fue determinado mediante el método Bradford modificado, para el cual la mezcla de reacción contiene 1 ml de reactivo Bradford comercial (Bio-Rad), 20 µl de sobrenadante y 80 µl de NaCl 0,15 M (Bradford, 1976); se utilizó una curva de calibración confeccionada con albúmina de suero bovino (BSA) 1 mg ml<sup>-1</sup> como estándar.

# 3.6.3.2 Contenido de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Para determinar el contenido de  $H_2O_2$  se emplearon varillas comerciales (Merck) con una sensibilidad de 0,5-25 mg  $\Gamma^1$  y un equipo RQflex (Merck). Los niveles del radical fueron determinados tanto en el medio de incubación (directamente), como en el micelio. El micelio fue cosechado por centrifugación (10000 rpm por 15 min) y macerado en nitrógeno líquido en amortiguador fosfato de potasio 20 mM (pH 7,0) (Choi *et al.*, 1997). La muestra fue centrifugada a 5000 rpm por 5 min, y el sobrenadante fue utilizado para medir el contenido del radical. Los resultados, en ambos casos, fueron estandarizados por el contenido de proteínas de las muestras (Bradford, 1976).

#### 3.6.3.3 Actividad de enzimas antioxidantes

Para la obtención del extracto enzimático el micelio fue cosechado por centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos y macerado en N<sub>2</sub> líquido en buffer fosfato de potasio 20 mM (pH 7,0) (Choi *et al.*, 1997). La muestra fue centrifugada a 5000 rpm por 5 min y el sobrenadante fue utilizado para medir la actividad enzimática. Los resultados fueron estandarizados por el contenido de proteínas de las muestras (Bradford, 1976).

(i) Actividad Catalasa (CAT). La actividad catalasa fue determinada por el decrecimiento de la absorbancia a 240 nm. La reacción fue iniciada por la adición de 5 μl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1 ml de buffer fosfato/citrato 50 mM (pH 7.0), en presencia de 30 μl del extracto enzimático (Gil-ad *et al.*, 2000; Malolepsza, 2004). Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que disminuye en 0,0001 la absorbancia con respecto al control.

- (ii) Actividad guaiacol peroxidasa (POD). La actividad POD se ensayó midiendo la aparición de tetraguaiacol a 470 nm por 45 segundos. La mezcla de reacción contenía 1 ml de buffer de extracción, 5 μl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 5 μl de guaiacol y 10 μl de extracto enzimático. La actividad de la enzima se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de 26,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Gil-ad *et al.*, 2000).
- (iii) Actividad ascorbato peroxidasa (APX). La actividad APX se determinó midiendo la descomposición del ascorbato a 290 nm por 45 segundos. La mezcla de reacción contenía 1 ml de buffer de extracción, 5 μl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %, 40 μl de ácido ascórbico 10 mM y 20 μl de extracto enzimático. La actividad de la enzima se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> (Gil-ad *et al.*, 2000).
- (iv) Actividad superóxido dismutasa (SOD). La actividad SOD fue determinada midiendo la inhibición de la reducción fotoquímica del reactivo azul de tetrazolio (NBT). La mezcla de reacción contenía 700 μl de buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 8,5), 10 μl de EDTA 10 mM, 10 μl de metionina, 10 μl de riboflavina 2 mM, 200 μl de NBT 3 mM y 100 μl de extracto enzimático. Los tubos se iluminaron por 15 minutos y se leyó la absorbancia a 560 nm. Los controles correspondieron a mezclas de reacción sin iluminar. Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que causa el 50% de inhibición de la reducción de NBT (Malolepsza, 2004).

# 3.6.4 Producción y actividad in vitro de enzimas involucradas en la patogénesis En este estudio, se evaluó el efecto del extracto etanólico de quillay, en la producción y actividad de las enzimas cutinasa (p-nitrofenil butirato esterasa), poligacturonasa (PG) y lacasa de B. cinerea.

Para inducir la producción de las enzimas, se inocularon matraces de 125 ml conteniendo 20 ml de medio extracto malta-levadura líquido, con una suspensión de conidias de 1 x 10<sup>5</sup> conidias ml<sup>-1</sup>. El micelio pre-crecido durante 3 días a 22° C, fue molido utilizando perlas de vidrio e inoculado en matraces conteniendo medio de cultivo mínimo líquido, suplementado con cutina 1% p/v como fuente de carbono para la producción de cutinasa, o con pectina 1%

p/v para la producción de PG y lacasa (Cotoras *et al.*, 2004). Posteriormente se adicionaron alícuotas del solvente (control negativo) o del extracto de quillay (concentraciones finales de 100, 250 y 500 μg ml<sup>-1</sup>) al medio de cultivo. Los cultivos fueron incubados a 22° C en oscuridad. Como extracto enzimático se utilizó el medio de incubación previamente filtrado por lana de vidrio (Cotoras *et al.*, 2004). La cutina de tomate fue preparada según la técnica de Baker y Bateman (1978) modificada por Cordero y Cotoras (1997).

Para evaluar el efecto del extracto de quillay en la actividad *in vitro* de las enzimas, se adicionaron alícuotas (100 μl) del solvente o del extracto en diferentes concentraciones finales (100, 250 y 500 μg ml<sup>-1</sup>), a las mezclas de reacción empleadas para determinar la actividad de las enzimas (Goetz *et al.*, 1999). Para obtener los extractos enzimáticos, matraces con medio de cultivo mínimo suplementado con cutina 1% p/v (actividad cutinasa) o pectina 1% p/v (actividad lacasa y PG) como fuente de carbono, fueron inoculados con 800 μl de micelio precrecido (48 horas) e incubados a 22° C por 10 días. Como extracto enzimático se utilizó el medio de incubación previamente filtrado por lana de vidrio (Cotoras *et al.*, 2004). Los resultados fueron estandarizados por el contenido de proteínas de las muestras (Bradford, 1976) y expresados como porcentaje de inhibición aplicando la fórmula [(C-T)/C \* 100)], donde C y T correspondieron a la actividad enzimática en los cultivos control y en aquellos tratados con los extractos de quillay, respectivamente.

# 3.6.4.1 Cutinasa (*p*-nitrofenil butirato esterasa)

La actividad cutinasa se determinó utilizando el sustrato análogo *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB), el cual es hidrolizado a *p*-nitrofenol por acción de la enzima. La liberación de *p*-nitrofenol se cuantificó espectrofotométricamente a 405 nm (Purdy y Kolattukudy, 1973). La reacción fue iniciada por la adición de una cantidad apropiada del extracto enzimático a 3 ml de buffer fosfato de sodio (pH 8,0) suplementado con *p*-NPB 0,62 mM y 11,2 mg de Triton X-100. La mezcla fue incubada a 22° C durante 10 min, antes de cuantificar la absorbancia. Una unidad enzimática (U ml<sup>-1</sup>) fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de *p*-nitrofenol por min (Cotoras *et al.*, 2004).

## 3.6.4.2 Poligalacturonasa (PG)

La actividad de la enzima se cuantificó empleando el método para medir azúcares reductores de Nelson (1944), utilizando el reactivo DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) como muestra estándar (Miller, 1959). Como sustrato se utilizó ácido poligalacturónico 1% p/v. La mezcla de reacción contenía 200 µl de ácido poligalacturónico 1 % (p/v); 200 µl de buffer acetato de sodio 500 mM (pH 6,5) y 50 µl de la muestra enzimática. La mezcla fue incubada a 30° C por 10 min. Una unidad enzimática (U ml<sup>-1</sup>) fue definida como aquella que libera 0,5 mmoles de grupo reductor por minuto.

### 3.6.4.3 Lacasa

La actividad lacasa se determinó espectrofotométricamente a 530 nm utilizando siringaldazina como sustrato (Chefetz *et al.*, 1998). La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente monitoreando la absorbancia a 530 nm. La mezcla de reacción contenía 30 µl del extracto enzimático y siringaldazina 0,1 mM en buffer fosfato de sodio 50 mM (pH 6,0), la cual fue incubada a 22° C por 15 min antes de determinar la absorbancia. Una unidad enzimática (U ml<sup>-1</sup>) fue definida como la cantidad de enzima que incrementa la absorbancia en 0,1 en 1 min (Cotoras *et al.*, 2004).

### 3.7 Fraccionamiento del extracto etanólico de brotes in vitro de quillay

## 3.7.1 Obtención de fracciones

El extracto etanólico, previamente rotoevaporado a sequedad y disuelto en una pequeña cantidad del mismo solvente, fue mezclado con gel de sílice Merck de grano 60-200 micrones (30 gramos por cada gramo de extracto) y fraccionado en una placa filtrante (sistema al vacío), utilizando los siguientes sistemas de solventes: *n*-hexano, *n*-hexano:acetato de etilo (9:1), n-hexano:acetato de etilo (5:5), acetato de etilo (100%), acetato de etilo:etanol (5:5) y etanol (100%), obteniendo seis fracciones.

### 3.7.2 Actividad antifúngica in vitro de las fracciones

Se evaluó el efecto de cada fracción en el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*, utilizando el método de dilución en medio de cultivo agar extracto malta-levadura blando, de acuerdo al método empleado por Cotoras *et al.* (2004). Las fracciones fueron ensayadas en concentración final de 200 µg ml<sup>-1</sup>.

# 3.8 Identificación de constituyentes antifúngicos en el extracto activo

### 3.8.1 Detección de metabolitos del tipo saponina

La presencia de saponinas en el extracto fue determinada mediante Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia (HPLC), de acuerdo al método empleado por Copaja *et al.* (2003) con algunas modificaciones. Como estándar se utilizó Quillaja Ultra Powder producido por Natural Response S.A. (Desert King Ldta). Soluciones del estándar en diferentes concentraciones fueron empleadas para realizar curvas de calibración.

El análisis por HPLC (equipo Agilent 1100 con arreglo de diodo) de las muestras (20  $\mu$ l) se realizó en una columna RP-18 de fase reversa, bajo condiciones isocráticas (MeOH:H<sub>2</sub>O = 90:10) a un flujo de 0,8 ml min<sup>-1</sup>. Las señales fueron detectadas a 230 nm. La estructura saponina fue identificada en los extractos por comparación de los tiempos de retención obtenidos con la solución estándar (Rt =1,6  $\pm$  0,20 min). Cada muestra fue inyectada tres veces. La concentración del metabolito fue determinada mediante regresión lineal a partir de las curvas de calibración.

## 3.8.2 Detección de compuestos fenólicos

La detección de compuestos fenólicos fue determinada mediante HPLC. Se realizaron curvas de calibración utilizando estándares de los siguientes compuestos fenólicos: los ácidos *p*-coumárico, salicílico, gálico, clorogénico, siríngico, vaníllico, caféico, shikímico y dihidribenzóico; quercetina, esculetina, naringenina, rutina y escopoletina.

El análisis de las muestras (20  $\mu$ l) se realizó en una columna RP-18 de fase reversa a un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. Los compuestos fueron detectados a las siguientes longitudes de honda: 254, 280, 314 y 340 nm. La fase móvil consistió en acetonitrilo (solvente A) y ácido sulfúrico ( $H_3PO_4$ ) 1% en agua (solvente B). El gradiente utilizado fue similar al empleado por Ruhland y Day (2000) con algunas modificaciones, el cual se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Gradiente de solventes utilizado en la detección de compuestos fenólicos

Tiempo (min)	0	3	4	10	13	17	18	20
% Solvente A	100	75	72	67	67	0	100	100
% Solvente B	0	25	28	33	33	100	0	0

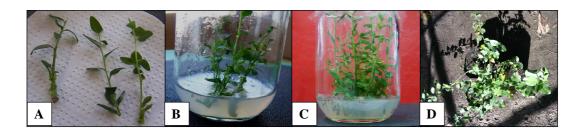
### 3.9 Análisis estadístico de datos

Los resultados fueron analizados a través de Análisis de Varianza de una Vía (One-Way ANOVA) y las comparaciones entre promedios se realizaron por medio de la Prueba de Comparación Múltiple de Promedios de Tukey, a un nivel de significancia del 5% ( $p \le 0.05$ ). Los datos fueron analizados por pruebas de normalidad de datos y homogeneidad de varianzas. Además, se determinó la desviación estándar (DE) de cada set de datos experimentales. Se utilizó el programa estadístico SPSS Versión 13.0.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

# 4.1 Cultivo y propagación in vitro de quillay

En este estudio se logró implementar exitosamente un sistema de cultivo in vitro de quillay a partir de yemas axilares. La optimización de los métodos de desinfección de explantes y la formulación del medio de cultivo, permitieron desarrollar apropiadamente la etapa de micropropagación de brotes. Además, se logró establecer un procedimiento de aclimatación para el traspaso a invernadero de las plantas obtenidas mediante cultivo in vitro. La metodología utilizada resultó eficiente, pues se obtuvo un Índice de Multiplicación igual a 5, lo que significa que a partir de 1 brote, se obtuvieron un promedio de 5 brotes luego de 1 mes de cultivo (Corkovic, 2003). Al mes de cultivo, se logró la producción de brotes con 6-7 entrenudos, de 7-8 cm de altura, con un valor de materia seca promedio de 11%, lo que es considerado adecuado para plantas cultivadas in vitro (Chacón et al., 2000; Olivera et al., 2000). Cabe destacar que, si bien el cultivo in vitro de quillay ha sido implementado previamente en nuestro país, tanto a partir de semillas (Prehn et al., 2003) como utilizando la técnica de embriogénesis somática (Vega y Prehn, 2005), éste constituye el primer reporte de un sistema de cultivo in vitro para esta especie a partir de yemas axilares, por lo que representa un aporte al desarrollo de técnicas biotecnológicas para el estudio y utilización comercial de la misma, sin arriesgar su preservación como recurso nativo. En la Figura 12 se muestra la secuencia de las etapas de micropropagación de brotes.



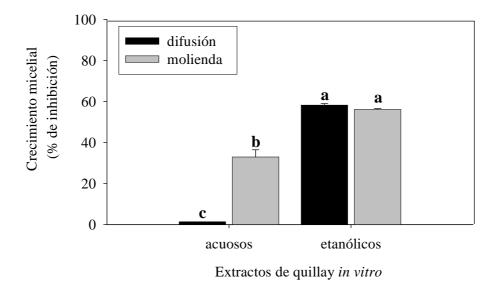
**Figura 12.** Etapas de la micropropagación de brotes *in vitro* de quillay (A) Explantes de micropropagación, (D) Multiplicación de explantes, (C) Brotes de 1 mes de incubación y (D) Plantas de quillay *in vitro* establecidas en invernadero.

## 4.2 Actividad antifúngica in vitro en B. cinerea de extractos de quillay in vitro

Con el objetivo de determinar la actividad antifúngica *in vitro* en *B. cinerea* de extractos de brotes de quillay obtenidos mediante cultivo *in vitro*, se evaluó el efecto de éstos en el crecimiento micelial y germinación de conidias del patógeno.

## 4.2.1 Efecto de los extractos en el crecimiento micelial in vitro

En primera instancia se realizó un ensayo para comparar la actividad antifúngica de extractos obtenidos mediante dos metodologías de extracción diferentes (difusión y molienda en  $N_2$  líquido), para lo cual se evaluó el efecto de extractos acuosos y etanólicos de brotes in *vitro* de quillay, en el crecimiento micelial *in vitro* del patógeno. Los resultados se muestran en la Figura 13.

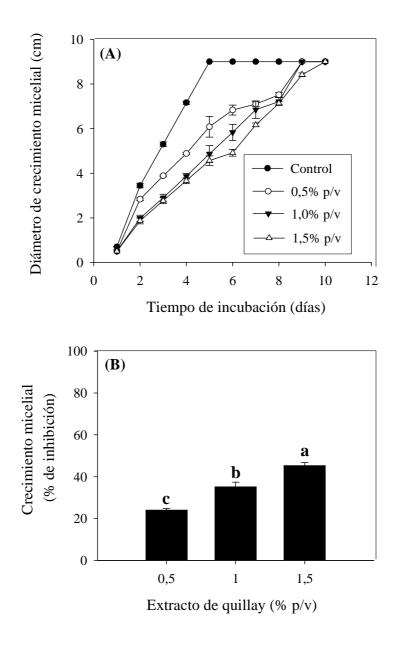


**Figura 13.** Efecto de extractos acuosos y etanólicos de brotes *in vitro* de quillay, obtenidos mediante diferentes técnicas de extracción, en el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* Pers. Los extractos fueron evaluados en una concentración final de 1,0% p/v. Como control se utilizó el solvente (agua o etanol 85% v/v, respectivamente). Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE. Letras distintas en las barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

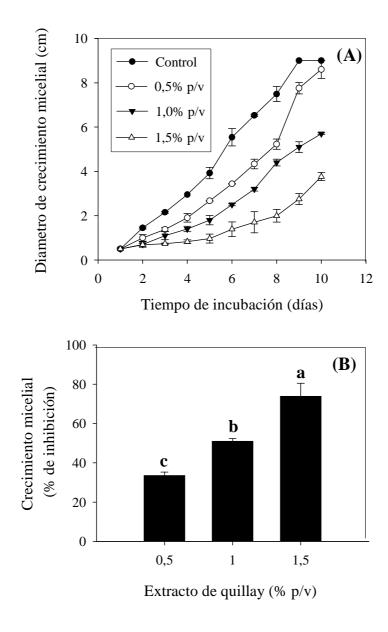
Los resultados (Figura 13), indicaron que sólo la técnica de extracción por molienda generó extractos acuosos con una actividad antifúngica interesante, y que para ambas metodologías de extracción la acción fungitóxica de los extractos etanólicos fue significativamente mayor a la de extractos acuosos ( $p \le 0.05$ ). De esta forma, con extractos acuosos preparados mediante difusión y molienda se obtuvieron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del patógeno de 1,4 y 32,9%, respectivamente, mientras que extractos etanólicos, obtenidos mediante ambas metodologías, exhibieron un nivel similar (no significativamente diferente,  $p \le 0.05$ ) de actividad, con porcentajes de inhibición de 58,3 y 56,2% (Figura 13).

El hecho de que la actividad antifúngica de extractos acuosos obtenidos mediante molienda fuera mayor a la de aquellos obtenidos por difusión, respondería a que el proceso de macerado del tejido vegetal incrementa la superficie de contacto del tejido con el solvente optimizando el proceso de extracción de moléculas bioactivas, y por otra parte, a que esta técnica provocaría la ruptura de las células vegetales, lo que derivaría en que los extractos presenten metabolitos no sólo solubles, sino además aquellos almacenados a nivel de organelos celulares, principalmente en vacuolas, los cuales por lo general se caracterizan por exhibir altos niveles de biotoxicidad (Osbourn, 1996 a y b; Edwards y Gatehouse, 1999; Morrissey y Osbourn, 1999; Lambers et al., 2000). Por otro lado, la diferencia en los niveles de actividad fungitóxica entre extractos acuosos y etanólicos, se explicaría, al menos en parte, porque el etanol, al ser un solvente de baja selectividad y capaz de afectar la integridad de las membranas celulares por deshidratación (Elvir, 1993), generaría extractos con una mayor cantidad de moléculas bioactivas, y además permitiría la obtención de metabolitos almacenados en los mismos. De acuerdo a ésto y en base a los resultados obtenidos, es posible inferir que los constituyentes antifúngicos de la especie en estudio corresponderían probablemente a moléculas almacenadas a nivel vacuolar.

Con el propósito de analizar si la acción fungitóxica de los extractos es dosis-dependiente, se evaluó el efecto de los extractos, en diferentes concentraciones, tanto acuosos (Figura 14) como etanólicos (Figura 15), en el crecimiento micelial *in vitro* del patógeno. Considerado que la técnica de molienda fue la que produjo extractos con un mayor nivel de actividad, para llevar a cabo los bioensayos siguientes, se utilizó sólo esta metodología de extracción.



**Figura 14.** Efecto de extractos acuosos de brotes *in vitro* de quillay en el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* Pers. (A) Cinética de crecimiento diaria; (B) Porcentage de inhibición del crecimiento micelial, calculado al quinto día de incubación. Como control se utilizó agua destilada. Cada punto (A) o barra (B) representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE. Letras distintas en las barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).



**Figura 15.** Efecto de extractos etanólicos de brotes *in vitro* de quillay en el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* Pers. (A) Cinética de crecimiento diaria; (B) Porcentage de inhibición del crecimiento micelial, calculado al quinto día de incubación. Como control se utilizó etanol 85% v/v. Cada punto (A) o barra (B) representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE. Letras diferentes en las barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey,  $p \le 0.05$ ).

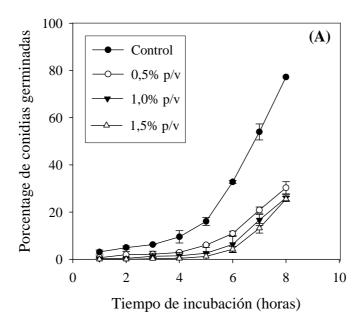
Los resultados indican que el crecimiento de B. cinerea fue reducido por efecto de los extractos acuosos y etanólicos de brotes  $in\ vitro$  de quillay en todas las concentraciones evaluadas (p  $\leq$  0,05), y que el efecto antifúngico de ambos tipos de extactos fue dosisdependiente, incrementando a medida que la concentración de los extractos fue mayor. En este contexto, el efecto dosis-dependiente de la actividad antifúngica  $in\ vitro$  en hongos fitopatógenos de extractos de quillay en condiciones naturales de crecimiento, ha sido reportado previamente (Chapagain  $et\ al.$ , 2007).

En la presencia de agua destilada, el crecimiento micelial del patógeno alcanzó un máximo luego de 5 días de incubación, mientras con los extractos acuosos, el crecimiento máximo fue alcanzando después de 8, 8 y 9 días, con las concentraciones de 0,5; 1,0 y 1,5% p/v, respectivamente (Figura 14A). De esta forma, los niveles de inhibición del crecimiento micelial, calculados al quinto día de incubación, alcanzaron valores de 24, 35 y 45% con las concentraciones de 0,5; 1 y 1,5% p/v, respectivamente (Figura 14B). Al igual que lo ocurrido con extractos acuosos, se observó una disminución importante en el crecimiento de botritis en presencia de los extractos etanólicos, sin embargo en este caso, el efecto fungitóxico fue mayor y el crecimiento del patógeno se retardó por un mayor rango de tiempo. Los resultados muestran que en presencia del solvente (etanol 85% v/v), el crecimiento micelial alcanzó el máximo después del sexto día de incubación, mientras en la presencia del extracto etanólico, en la menor concentración, el crecimiento máximo ocurrió sólo a partir del día 10 (Figura 15A). Así, los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial alcanzaron valores de 33, 50 y 73% con las concentraciones de 0,5; 1 y 1,5% p/v, respectivamente (Figura 15B). Considerando que los extractos etanólicos de brotes in vitro de quillay, mostraron ser más activos que extractos acuosos, en la mayoría de los bioensayos cuyos resultados se describen a continuación, se utilizó sólo este tipo de extracto.

# 4.2.2 Efecto del extracto etanólico en la germinación de conidias

El efecto de extractos etanólicos de quillay *in vitro* en la germinación de conidias de *B. cinerea*, se muestra en la Figura 16. Los resultados indican que el extracto, en todas las concentraciones evaluadas (0,5; 1,0 y 1,5% p/v), retardó el proceso de germinación de conidias del patógeno. En ausencia del extracto las conidias germinaron un 80% a la octava

hora de incubación, mientras en presencia del extracto a la misma hora, sólo se observó un 40% de conidias germinadas, y el 80% de germinación se alcanzó a las 11 horas de incubación (datos no mostrados) (Figura 16). A diferencia de lo ocurrido con el efecto del extracto en el crecimiento micelial *in vitro* del patógeno, no se observó un efecto de la dosis utilizada ( $p \le 0.05$ ), ya que bajo todas las concentraciones evaluadas se alcanzó un efecto inhibitorio similar, de aproximadamente 60% a la octava hora de incubación.



**Figure 16.** Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la germinación de conidias de *B. cinerea* Pers. Los extractos fueron evaluados en concentraciones finales de 0,5; 1,0 y 1,5% p/v. Como control se utilizó el solvente (etanol 85% v/v). La concentración de solvente en el control y los tratamientos fue la misma. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes <u>+</u> DE.

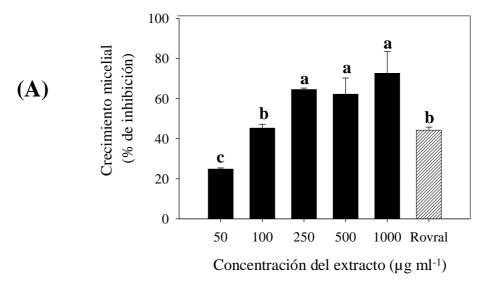
Cabe mencionar, que durante el proceso de conteo de conidias en el microscopio óptico no se observó, en las conidias tratadas con el extracto, anormalidades morfológicas como se ha descrito para otros metabolitos secundarios de plantas. Tal es el caso del resveratrol, un estilbeno producido en uvas (*V. vinifera*) sometidas a diferentes condiciones de estrés, el cual induce la formación de tubos germinativos adicionales y curvos en conidias de *B. cinerea* (Adrian, 1998).

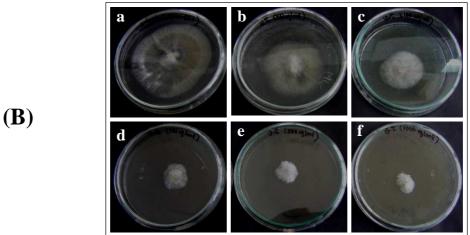
## 4.2.3 Dosis efectiva media del extracto etanólico

Con el propósito de determinar la Dosis Efectiva Media (ED<sub>50</sub>) del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en *B. cinerea*, y a su vez comparar el nivel de actividad antifúngica del mismo con respecto a la acción fungitóxica de un fungicida sintético comercial, el extracto etanólico se rotoevaporó a sequedad y se evaluó el efecto de soluciones etanólicas (etanol 85% v/v) en diferentes concentraciones finales (50, 100, 250, 500 y 1000 µg ml<sup>-1</sup>), en el crecimiento micelial *in vitro* del patógeno.

Los resultados obtenidos, los cuales se muestran en la Figura 17, indicaron que el extracto en una concentración de 250 µg ml<sup>-1</sup> inhibió el crecimiento micelial *in vitro* del hongo en un 64,5%, superando al efecto del fungicida Rovral (iprodione-dicarboximida), el cual, a la misma concentración y bajo las mismas condiciones, redujo el crecimiento micelial del patógeno en un 44%. El efecto fungitóxico del extracto fue dosis-dependiente para el rango de concentraciones inferiores a 250 µg ml<sup>-1</sup>, mientras a concentraciones mayores el efecto inhibitorio se mantuvo. Este fenómeno podría ser atribuido a la presencia en el extracto de algún factor de crecimiento el cual, al incrementar la concentración del extracto, provocaría una estimulación del crecimiento del hongo, tal y como se ha reportado para la actividad antifúngica de extractos crudos de *Ageratum conyzoides* L. y *Achillea millefolium* L. en el hongo fitopatógeno *Didymella bryoniae* (Fiori *et al.*, 2000).

La  $ED_{50}$  del extracto, calculada utilizando análisis de regresión lineal en el rango de concentraciones bajo el cual se observó un efecto dosis dependiente (concentraciones  $\leq 250$  µg ml<sup>-1</sup>), fue de aproximadamente 160 µg ml<sup>-1</sup> (r = 0,91), valor considerado bueno según reportes de la actividad antifúngica de otros extractos crudos de plantas en *B. cinerea* ( $ED_{50}$  desde 25 a 500 µg ml<sup>-1</sup>) (Shimoni *et al.*, 1993; Antonov *et al.*, 1997; Dafereraa *et al.*, 2003; Boyraz, 2006). Por otro lado, la  $ED_{50}$  del extracto es un valor interesante pensando en su potencial uso como fungicida comercial, considerando que no se trata de un compuesto puro, lo que presenta varias ventajas, dentro de las que se incluyen un menor costo y tiempo de obtención del producto, y el inferior riesgo de desarrollo de resistencia en el hongo a controlar, debido a que los extractos crudos de plantas, al estar constituidos por una mezcla de metabolitos bioactivos, exhiben múltiples mecanismos de acción.





**Figura 17.** Efecto de soluciones del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* Pers. (A) Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial. Como control positivo se utilizó el fungicida Rovral (dicarboximida) a una concentración final de 250 μg ml<sup>-1</sup> (barra achurada). Los porcentajes de inhibición fueron calculados al séptimo día de incubación. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE. Letras diferentes en las barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05). (B) Crecimiento radial de micelio de *B. cinerea* en medio de cultivo sólido suplementado con el solvente como control negativo (a), y con el extracto de quillay en concentraciones finales de 50 (b), 100 (c), 250 (d), 500 (e) y 1000 (f) μg ml<sup>-1</sup>, luego de cinco días de incubación.

Los resultados de la evaluación de actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de brotes *in vitro* de quillay, muestran que éstos no inhiben completamente el crecimiento micelial y la germinación de conidias de *B. cinerea*, sin embargo, retardan ambos procesos en forma importante. Esto podría ser explicado por la habilidad de *B. cinerea* de biotransformar metabolitos con actividad antifúngica luego de un período de incubación. En este contexto, en la literatura se reporta que este patógeno biotransfoma compuestos tales como flavonoides, saponinas y terpenoides (Quinde *et al.*, 1998; Aleu *et al.*, 1999; Aleu y Collado, 2001; Aleu *et al.*, 2001; Farooq y Tahara, 1999 Y 2000; Farooq *et al.*, 2002)

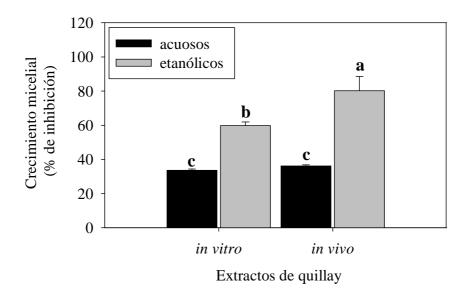
### 4.2.4 Actividad fungitóxica de extractos de quillay in vitro & quillay in vivo

Para comparar la actividad antifúngica de brotes *in vitro* de quillay (quillay *in vitro*) con la de aquellos preparados a partir de hojas de ejemplares en condiciones naturales de crecimiento (quillay *in vivo*), se evaluó el efecto de ambos tipos de extractos, tanto acuosos como etanólicos, en el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*.

Los resultados, los cuales se muestran en la Figura 18, indicaron que extractos de hojas de quillay *in vivo* inhiben en alto grado el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* y que, al igual que lo ocurrido con extractos de brotes *in vitro*, el extracto etanólico exhibió una actividad fungitóxica significativamente mayor (80% de inhibición) que la de extractos acuosos (36% de inhibición) ( $p \le 0.05$ ). Si bien estudios previos han reportado que extractos de quillay, obtenidos de la corteza y madera de árboles en condiciones naturales de crecimiento, exhiben propiedades fungitóxicas en hongos fitopatógenos (Villegas, 1999; Apablaza *et al.*, 2002; Moya, 2003; Chapagain *et al.*, 2007), este constituye el primer reporte de que extractos de hojas de esta especie, presentan actividad antifúngica en *B. cinerea*.

Villegas (1999), demostró que el extracto comercial de quillay QL Ultra (16% de saponinas) inhibe tanto el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*, como el desarrollo *in vivo* del patógeno en uvas. Por otra parte, se ha reportado que los extractos comerciales de quillay QL 1000 (20% de saponinas), QL 30B (15-18% de saponinas) y QL Ultra, reducen el desarrollo de oídio [*Erysiphe cichoracearum* DC. Ex Mérat y *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht ex Fr. Poll.)] en cucurbitáceas bajo condiciones de invernadero (Apablaza *et al.*, 2002), los cuales

también han mostrado un efecto de control en el patógeno *Blumeria graminis* fsp. *tritici* en plantas de trigo (Moya, 2003). Además, extractos comerciales de quillay, han mostrado una acción fungitóxica *in vitro* en los hongos *Alternaria solani*, *Phytium ultimum*, *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae* (Chapagain *et al.*, 2007)



**Figura 18**. Efecto de extractos de quillay *in vitro* e *in vivo*, en el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* Pers. Los extractos (acuosos y etanólicos), fueron evaluados en concentraciones finales de 1,0% p/v. Como control se utilizaron los respectivos solventes. Los porcentajes de inhibición fueron calculados al quinto día de incubación. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE. Letras diferentes indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

Por otra parte, los resultados (Figura 18) mostraron que el efecto fungitóxico de extractos acuosos de quillay *in vitro* e *in vivo*, no fue significativamente diferente ( $p \le 0.05$ ). Sin embargo, los extractos etanólicos de quillay *in vivo* presentaron una actividad antifúngica 20% superior a la de extractos etanólicos de brotes *in vitro* (Figura 18). Ésto, podría responder a que plantas *in vitro*, al ser cultivadas en condiciones de crecimiento controladas y de asepsia, se encuentran libres del efecto de condiciones ambientales desfavorables y del ataque por patógenos e insectos (Vanisree *et al.*, 2004), por lo que generalmente sintetizan una menor cantidad de metabolitos secundarios (Giulietti y Ertola, 1999), ya que uno de los principales

roles de estas moléculas en plantas es actuar como agentes protectores frente a situaciones de estrés abiótico (Taiz y Seiger, 1998; Lambers *et al.*, 2000) y biótico (Levin, 1976; Cronquist 1977), siendo sintetizados en mayores niveles en respuesta a tales condiciones (Grayer y Harborne, 1994; Morrissey y Osbourn, 1999). De acuerdo a ésto, es posible inferir que la menor actividad antifúngica del extracto etanólico de quillay *in vitro* se debería probablemente a un menor contenido de moléculas bioactivas, con respecto al de extractos de plantas *in vivo*.

A pesar del mayor efecto fungitóxico de extractos etanólicos de quillay in vivo, la producción a nivel comercial de extractos bioactivos utilizando plantas intactas, presenta una serie de limitaciones (Calva-Calva et al., 2002). En este contexto, si bien el uso de plantas en condiciones naturales de crecimiento ha sido, desde tiempos prehistóricos, la principal estrategia de obtención de extractos vegetales bioactivos o metabolitos secundarios de interés a gran escala (Vanisree et al., 2004), debido a la explotación indiscriminada de las fuentes naturales, varias especies vegetales se encuentran actualmente en peligro de extinción (Calva-Calva et al., 2002). Por otra parte, uno de los mayores problemas del uso de plantas in vivo en la producción de moléculas activas es asegurar el suministro constante de los compuestos de interés, ya que los rendimientos se ven afectados por las condiciones de cultivo, variaciones geográficas, adversidades climáticas y problemas fitosanitarios (Villalobos, 1985; Vanisree et al., 2004). En respuesta a ésto, el cultivo in vitro de plantas ha mostrado ser una alternativa viable para la producción industrial de metabolitos vegetales bioactivos, sin arriesgar la conservación del germoplasma (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002; Vanisree et al., 2004), el cual ofrece sistemas de producción constantes (por ser independiente de los cambios ambientales), y consistencia en los rendimientos y la calidad de los productos obtenidos (Alfermann y Petersen, 1995; Calva-Calva et al., 2000; Vanisree et al., 2004).

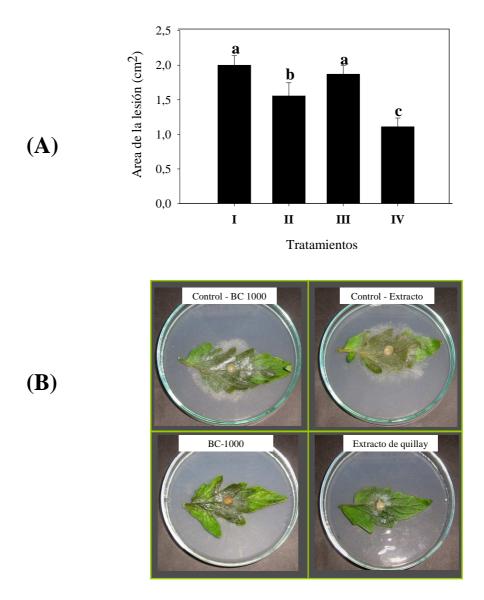
De acuerdo a estos antecedentes, los resultados obtenidos en este estudio y los reportes que indican que la existencia de árboles adultos de quillay ha disminuido en forma importante en nuestro país (Prehn *et al.*, 2003), el cultivo *in vitro* de plantas constituiría una alternativa interesante y apropiada para la utilización de esta especie en la formulación de fungicidas naturales para el control de *B. cinerea*.

### 4.3 Actividad antifúngica in vivo en B. cinerea de extractos de quillay in vitro

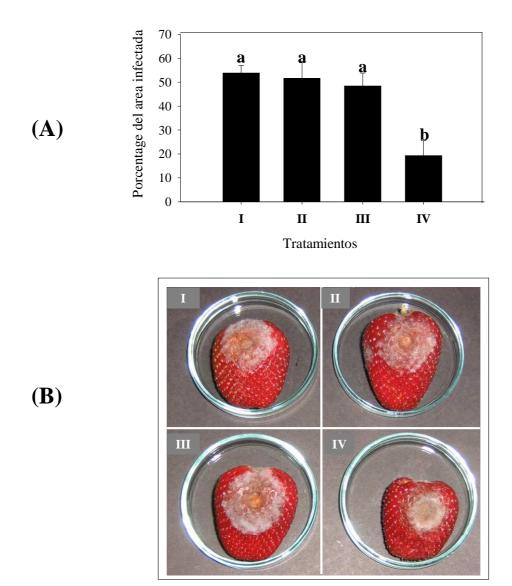
Estudios han demostrado que las sustancias que muestran actividad antifúngica *in vitro*, en la mayoría de los casos exhiben una acción fungitóxica *in vivo* (Kuhn y Hargreaves, 1987; Chapagain *et al.*, 2007). En este contexto, con el propósito de determinar si el efecto antifúngico *in vitro* en *B. cinerea* del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay, resulta en un menor desarrollo del patógeno en condiciones *in vivo*, se evaluó el efecto de soluciones del extracto en la capacidad de este hongo de infectar tejido vegetal en condiciones controladas de incubación, para lo cual se utilizaron como modelo hojas cosechadas de tomate (Figura 19) y frutos de frutilla (Figura 20).

En la Figura 19 (A y B), se muestran los resultados del efecto protectivo del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay y del fungicida BC1000 (control positivo), en el desarrollo de infección por botritis en hojas de tomate, los cuales indicaron que BC1000 fue capaz de disminuir el desarrollo de la infección en el tejido vegetal, ya que el área de la lesión provocada por el patógeno en las hojas tratadas con este producto, fue menor a la de las hojas control. Sin embargo, el extracto etanólico de quillay (250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) inhibió el desarrollo fúngico en mayor grado. De esta forma, el área de lesión fúngica en las hojas control (2,0 y 1,8 cm<sup>2</sup> para control-BC1000 y control-extracto, respectivamente), o en aquellas tratadas con el fungicida BC-1000 (1,5 cm<sup>2</sup>), fueron superiores a la de las hojas tratadas con el extracto (1,1 cm<sup>2</sup>) (p  $\leq$  0,05) (Figura 19A).

Los resultados además indicaron que el extracto (250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) en estudio redujo el porcentaje de área infectada en frutos de frutilla con respecto al control (p  $\leq$  0,05) (Figura 20 A y B). Así, el área de infección promedio en los frutos control alcanzó un 53 y 48% (control-BC1000 y control-extracto, respectivamente), mientras que en los frutos tratados con el extracto de quillay fue de un 20%. Los niveles de desarrollo fúngico fueron inferiores en los frutos asperjados con el extracto, en comparación a los tratados con BC-1000 (p  $\leq$  0,05), el cual bajo esta metodología, no fue capaz de disminuir significativamente el crecimiento de este hongo en los frutos con respecto al control (51% de área infectada) (Figura 20 A).



**Figura 19**. Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la habilidad de *B. cinerea* de colonizar hojas de tomate. (A) Área de la lesión (cm²) en los frutos tratados, determinada al quinto día de incubación. Los resultados representan el promedio de 10 determinaciones  $\pm$  DE. Se realizaron 3 experimentos independientes. Letras diferentes en la barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05). Los tratamientos aplicados fueron: (I) Control - BC 1000 (agua destilada); (II) BC 1000 (fungicida orgánico natural); (III) Control - extracto (etanol 8,5% v/v) y (I) Extracto etanólico de quillay (250 μg ml¹); (B) Crecimiento del patógeno en las hojas tratadas, luego de 7 días de incubación.



**Figura 20**. Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en el grado de infección por *B. cinerea* en frutos de frutilla. (A) Porcentaje de área infectada en frutos tratados, calculada al quinto día de incubación. Los resultados representan el promedio de 16 determinaciones  $\pm$  DE. Se realizaron 3 experimentos independientes. Letras diferentes en la barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05). (B) Crecimiento de *B. cinerea* en frutos de tratados luego de 5 días de incubación. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: (I) Control-BC1000 (agua destilada); (II) BC 1000; (III) Control- extracto (etanol 8,5% v/v) y (IV) Extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay (250 μg ml<sup>-1</sup>).

La disminución del crecimiento fúngico que se observó tanto en hojas de tomate como en frutos de frutilla por efecto del extracto, respondería, de acuerdo a Cotoras *et al.* (2004), a la capacidad del mismo de retardar el crecimiento micelial *in vitro* y la germinación de conidias del patógeno.

Los resultados obtenidos en este estudio, demuestran que extractos etanólicos de brotes *in vitro* de quillay inhiben en forma importante el crecimiento de *B. cinerea* tanto *in vitro* como *in vivo*, y que el nivel de fungotoxicidad observado fue similar, e incluso superior, al de fungicidas comerciales utilizados actualmente para el control del patógeno en cultivos de importancia agrícola.

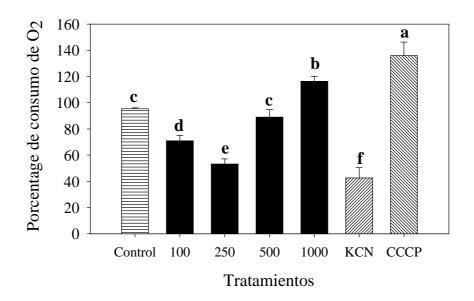
### 4.4 Mecanismos de acción del extracto etanólico de brotes in vitro de quillay

Con el propósito de dilucidar el mecanismo de acción que explicaría la acción fungitóxica en *B. cinerea* del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay, se evalúo el efecto de éste en el consumo de oxígeno en conidias (respiración celular), en la integridad de la membrana plasmática, en el grado de estrés oxidativo y en la actividad de enzimas involucradas en el proceso de patogénesis del patógeno.

# 4.4.1 Consumo de oxígeno en conidias

Estudios han demostrado que las moléculas bioactivas pueden actuar a nivel de la respiración celular de hongos a través de dos mecanismos, provocando una inhibición del sistema de transporte de electrones o un desacople del sistema de transporte para la producción de ATP (Griffin, 1994). La inhibición del sistema de transporte de electrones bloquea la producción de ATP y causa una reducción en el consumo de oxígeno (Ulrich y Mathre, 1972; Griffin, 1994). Por otro lado, para una acción de desacople, el sistema de transporte funciona normalmente, sin embargo la producción de ATP se desacopla del proceso de transporte de electrones debido a la disipación del gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna, por lo que en presencia de desacopladores, no se produce ATP y el consumo de oxígeno aumenta (Griffin, 1994; Canton *et al.*, 1996).

En este estudio se evaluó el efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay, en diferentes concentraciones (100, 250, 500 y 1000 μg ml<sup>-1</sup>), en el transporte basal de electrones (respiración sin suplementos metabólicos), utilizando una suspensión de conidias del hongo. Como controles positivos se empleó cianuro de potasio (KCN) 10 mM como inhibidor de la respiración, y carbamil cianuro-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) 10 μg ml<sup>-1</sup> como desaclopador. Los resultados se muestran en la Figura 21.



**Figura 21.** Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en el consumo de oxígeno de conidias de *B. cinerea* Pers. El extracto se evaluó en concentraciones de 100, 250, 500 y 1000 μg ml<sup>-1</sup> (barras negras). Como controles (barras achuradas) se utilizaron: etanol 85% v/v (control negativo), KCN 10 mM (inhibidor) y CCCP 10 μg ml<sup>-1</sup> (desacoplador). Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE. Letras diferentes en la barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

Los resultados indicaron que el consumo de oxígeno de la suspensión de conidias en presencia del solvente (etanol 85% v/v) como control negativo, alcanzó un 95,3 % respecto al consumo basal. Por otra parte, en presencia del inhibidor (KCN), el consumo de oxígeno disminuyó a un 42,6%, mientras el compuesto desacoplador (CCCP) provocó un aumento significativo del consumo, alcanzando un valor de 135,9% (Figura 21).

De acuerdo a los resultados, el KCN no inhibió completamente el consumo de oxígeno en la suspensión conidial del patógeno, lo cual se debería a que este hongo posee una oxidasa alternativa (AOX) constitutiva (Tamura *et al.*, 1999). En este contexto, estudios previos han reportado que las AOX en hongos, al igual que lo que ocurre con las AOX de plantas, es insensible al efecto del KCN y otros inhibidores de la citocromo *c* oxidasa (COX) (Siedow, 1995; Siedow y Umbach, 1995; Millar y Day, 1996). De esta forma, la presencia de una AOX en este patógeno permite que la respiración continué ocurriendo, aún en la presencia de inhibidores de la vía principal de la respiración (citocromo) (Joseph-Horne *et al.*, 2001)

En lo que refiere al efecto del extracto de quillay, se observó una disminución del consumo de oxígeno con respecto al control negativo con las concentraciones de 100 y 250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> (70,9% y 53,2% de consumo, respectivamente), sin embargo, bajo la concentración de 500  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, el nivel de consumo de oxígeno no fue diferente del detectado en presencia del solvente, mientras a 1000  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, el extracto incrementó significativamente el consumo con respecto al control negativo (116% de consumo) (p  $\leq$  0,05) (Figura 21). Estos resultados permiten inferir que el extracto en estudio altera el proceso de respiración celular en *B. cinerea*, el cual a bajas concentraciones actuaría como inhibidor de la cadena respiratoria, mientras a concentraciones mayores induce un aumento en el consumo de oxígeno actuando posiblemente como desacoplador.

Se ha reportado que el fungicida metoximinoacetamida SSF129 inhibe la oxidación de NADH en partículas sub-mitocondriales de B. cinerea, disminuyendo el consumo de oxígeno debido al bloqueo del transporte de electrones a través del complejo citocromo  $bc_1$ . Sin embargo, este fungicida no suprime, sino que al contrario, incrementa en forma dosis dependiente el consumo de oxígeno en las células del micelio, lo cual fue atribuido a que tales células, al contener una proteína AOX, tienen la capacidad de cambiar rápidamente el transporte de electrones hacia la vía alternativa en respuesta al bloqueo de la vía principal (citocromo) por efecto de SSF129, tal y como se ha reportado para otros hongos fitopatógenos expuestos a la acción de inhibidores de la respiración (Hayashi  $et\ al.$ , 1996). Además, en el mismo estudio se demostró que la vía alternativa parece no ser funcional cuando la vía principal es operativa, ya que a bajas concentraciones el consumo de oxígeno no se vio incrementado por efecto del fungicida (Tamura  $et\ al.$ , 1999).

En este contexto además se ha reportado que, a diferencia de otros hongos, los cuales presentan niveles muy bajos o indetectables de proteína AOX en condiciones normales de crecimiento, siendo ésta inducida en respuesta al bloqueo de la vía citocromo o inhibición de la síntesis de proteínas mitocondriales (Lambowitz *et al.*, 1989; Mizutani *et al.*, 1996; Yukioka *et al.*, 1997), las mitocondrias de *B. cinerea* presentan niveles fácilmente detectables de la proteína bajo las mismas condiciones, lo cual le da la capacidad a este patógeno de utilizar rápidamente la vía alternativa en respuesta al bloqueo de la vía citocromo (Tamura *et al.*, 1999).

De acuerdo a estos reportes, es posible sugerir que el extracto de quillay *in vitro* actuaría como inhibidor de la respiración de *B. cinerea*, y que el incremento en el consumo de oxígeno, observado por efecto del extracto en altas concentraciones, respondería a la activación de la vía alternativa del patógeno en respuesta a la inhibición de la vía principal, más que a su acción como agente desacoplador. Sin embargo, para comprobar dicha hipótesis, se deberían realizar estudios complementarios, tales como evaluar el efecto de inhibidores de la AOX del patógeno en el consumo de oxígeno en presencia del extracto (Mitani *et al.*, 2001), y determinar el efecto del extracto en estudio en la variación de pH extracelular, ya que los desacopladores impiden la formación del gradiente de pH favoreciendo el flujo de protones a través de la membrana provocando un brusco aumento del pH extracelular, lo que no ocurre con compuestos que actúan como inhibidores (Haraguchi *et al.*, 1992)

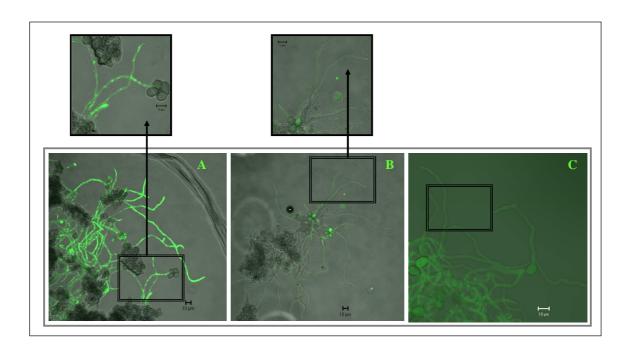
Una serie de estudios han demostrado que en el inicio del proceso de germinación las esporas fúngicas manifiestan un incremento en los niveles de respiración celular, debido a que las conidias dormantes pasan de un estado biológicamente quiescente a uno de alta actividad metabólica. Además, se ha reportado que la actividad respiratoria de conidias, para que la germinación ocurra, requiere la activación de una vía respiratoria sensible a cianuro (Brambl, 1975, 1977 y 1980; Brambl y Josephson, 1977; Josephson y Brambl, 1980; Stade y Brambl, 1981). De acuerdo a ésto, el efecto del extracto etanólico de quillay *in vitro* en la respiración de *B. cinerea* podría explicar en parte, el efecto inhibitorio del mismo en la germinación de conidias del patógeno.

## 4.4.2 Integridad de la membrana plasmática

Como se ha destacado anteriormente, ejemplares de quillay en condiciones naturales de crecimiento sintetizan una serie de saponinas como metabolitos mayoritarios (Guo *et al.*, 1998, 2000; Nord y Kenne, 1999, 2000; van Setten y van der Werken, 1996; San Martín y Briones, 1999; van Setten *et al.*, 2000; Nord *et al.*, 2001), compuestos que se caracterizan por afectar la integridad de la membrana plasmática de hongos fitopatógenos (Bangham y Horne, 1962; Keukens *et al.*, 1992; Keukens *et al.*, 1995 Armah *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2005). En base a ésto, y en el supuesto de que brotes de quillay cultivados *in vitro* fueran capaces de sintetizar saponinas, en este estudio se consideró interesante evaluar el efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la integridad de la membrana plasmática de *B. cinerea*, para lo cual se realizaron dos tipos de bioensayos.

El primero se basó en la captación del colorante fluorogénico Sytox Green en hifas de *B. cinerea*. Sytox Green es una molécula altamente afín a los ácidos nucleicos y que emite fluorescencia sólo cuando se encuentra unida a éstos. Este colorante no posee transportadores de membrana, por lo que sólo puede entrar a aquellas células cuya membrana plasmática se encuentre dañada (Thevissen *et al.*, 1999; Roth *et al.*, 1997). Para realizar este ensayo, hifas de *B. cinerea* pre-tratadas con una solución metanólica del extracto (etanólico rotoevaporado) de brotes *in vitro* de quillay, el solvente (control negativo) o etanol 70 % v/v (control positivo), fueron incubadas con el fluoróforo. De esta forma, hifas con núcleos fluorescentes indicaron daño en la membrana plasmática. La Figura 22, muestra las imágenes obtenidas por Microscopía Confocal de las hifas sometidas a los diferentes tratamientos.

Hifas pre-tratadas con etanol 70% v/v en presencia del fluoróforo presentaron núcleos fluorescentes (Figura 22 A), debido a que la molécula de Sytox Green fue capaz de entrar a las células, ya que este solvente, en altas concentraciones, provoca deshidratación de la membrana celular alterando su integridad (Elvir, 1993). En la Figura 22 B, se muestran las hifas pre-tratadas con el solvente como control negativo (en la misma concentración que el utilizado para la incubación con el extracto) y en la Figura 22 C aquellas pre-tratadas con el extracto (concentración final de 250 µg ml<sup>-1</sup>), ambas incubadas en presencia del colorante, y se observa que los dos grupos de hifas no exhibieron núcleos fluorescentes.

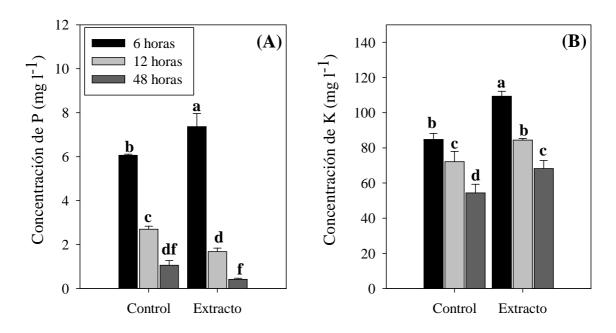


**Figura 22.** Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la integridad de la membrana plasmática de hifas *B. cinerea* Pers. Tinción de material nucleico con el fluoróforo Sytox Green. A: hifas pre-tratadas con etanol 70% v/v (control positivo); B: hifas pre-tratadas con el solvente (metanol 10% v/v, control negativo); C: hifas pre-tratadas con una solución metanólica del extracto (etanólico rotoevaporado) (250 μg ml<sup>-1</sup>); incubadas con Sytox Green. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento y 3 experimentos independientes.

Los resultados de este ensayo permiten concluir que el extracto en estudio no es capaz de provocar la ruptura de la membrana plasmática en hifas de  $B.\ cinerea$ , al menos en la concentración evaluada (dosis superior a la  $DE_{50}$ ), ya que las hifas tratadas con el extracto y en presencia del fluoróforo se conservaron íntegras, observando en éstas sólo fluorescencia basal tenue, en relación a la detectada en los núcleos de las hifas tratadas con el control positivo.

Por otra parte, una medida indirecta para determinar el efecto de compuestos antifúngicos en la integridad de la membrana citoplasmática de hongos, se basa en la determinación de la salida de iones intracelulares al medio de incubación (Choi *et al*, 1996; Cotoras *et al.*, 2004). En este contexto, se ha descrito que el fungicida Vinclozolin provoca un aumento en la conductividad del medio de incubación de *B. cinerea* debido a la salida de iones al medio

extracelular, lo cual se explicaría por el daño causado por el fungicida a nivel de membrana plasmática (Choi *et al.*, 1996). Por otro lado Cotoras *et al.* (2004), demostraron que el tratamiento de cultivos de *B. cinerea* con saponinas produce un incremento significativo en la concentración de fósforo en el medio de incubación (Cotoras *et al.*, 2004). Considerando estos reportes, y con el propósito de complementar los resultados del ensayo con Sytox Green, en este estudio se determinó, mediante el uso de ICP-OES, la concentración de fósforo (P) y potasio (K) en el medio de incubación de cultivos de *B. cinerea* tratados con el extracto etanólico de quillay. En la Figura 23, se muestra la concentración de P (en A) y K (en B) en el medio de incubación de micelio pre-crecido de *B. cinerea* en presencia del extracto en estudio (250 µg ml<sup>-1</sup>) o el solvente como control negativo, luego de 6, 12 y 48 horas de incubación.



**Figura 23.** Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la concentración de fósforo y potasio en el medio de incubación de *B. cinerea* Pers. Micelio pre-crecido fue incubado en buffer Tris-HCl 5 mM (pH 7,0) suplementado con el extracto de quillay (250 µg ml<sup>-1</sup>) o el solvente como control, a 22° C por 6, 12 y 48 horas. La concentración de P (A) y K (B) fue medida en el medio extracelular mediante ICP-OES. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE. Letras diferentes indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

Los resultados indicaron que en presencia del extracto de quillay, la concentración de P en el medio de incubación del patógeno fue mayor que la detectada en los cultivos control, sin embargo el efecto fue leve (20% de incremento) y sólo se observó a las 6 horas de incubación. Contrariamente, luego de 24 y 48 horas de incubación, la concentración de este analito fue menor en los cultivos tratados con el extracto con respecto a los cultivos control, con porcentajes de disminución de 37,7 y 60,3%, respectivamente. En lo que refiere a los niveles de K, la concentración de este analito aumentó en un 14, 14 y 20% con respeto al control por efecto del extracto, luego de 6, 12 y 48 horas de incubación, respectivamente (Figura 23). Es importante destacar que si bien se observó una diferencia en las concentraciones de ambos elementos a causa de la incubación con el extracto en estudio, esta fue más bien moderada.

Los resultados de ambos ensayos permiten inferir que, la membrana plasmática no constituye el principal blanco de acción de la actividad fungitóxica del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en *B. cinerea*, sin embargo éste sería capaz de alterar en forma moderada la permeabilidad de la membrana del patógeno.

### 4.4.3 Grado de estrés oxidativo

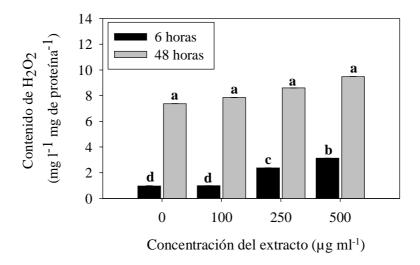
Se ha documentado ampliamente que en los organismos aeróbicos, las especies reactivas de oxígeno (EROs), tales como anión superóxido(O2°), peróxido de hidrógeno(H2O2) y radical hidroxilo (OH°), son generadas como productos normales del metabolismo, o bien en respuesta a condiciones ambientales adversas y diferentes tipo de estrés (Fridovich, 1978; Imloy y Linn, 1988; Marnett, 2002; Ayar-Kayali y Tarhan, 2004), las cuales son capaces de reaccionar con lípidos, proteínas, carbohidratos y el ADN, llegando a provocar la muerte celular (Fridovich, 1978; Imloy y Linn, 1988; Enjalbert *et al.*, 2007). Para sobrevivir a tales efectos, los hongos fitopatógenos desarrollan sistemas de defensa antioxidantes de tipo enzimático y no enzimáticos (Haliwell y Gutteridge, 1989; Ayar-Kayali y Tarhan, 2004; Chauhan *et al.*, 2006; Enjalbert *et al.*, 2007). Entre las enzimas antioxidantes destacan: superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la dismutación de O2° a H2O2; y catalasa (CAT) y peroxidasas, cuya función es neutralizan el H2O2 convirtiéndolo en agua (Levieux y Levieux, 1991; Liochev y Fridovich, 1994; Gil-ad *et al.*, 2001; Ayar-Kayali y Tarhan, 2004; Chauhan *et al.*, 2006; Enjalbert *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo ocurre cuando la producción o la velocidad de generación de EROs, excede a la producción de los sistemas de defensa antioxidantes, lo que resulta en una concentración de EROs tóxica para las células (Marnett, 2002; Ayar-Kayali y Tarhan, 2004). Se ha reportado que algunos fungicidas sintéticos comerciales son capaces de provocan estrés oxidativo en hongos fitopatógenos (Archer *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997; Patsoukis y Georgiou, 2006). Por otra parte, estudios han demostrado que la peroxidación de lípidos gatillada por EROs, provoca la desintegración estructural de membranas, inactivación de enzimas, liberación de enzimas unidas a la membrana, cambios en la fluidez de membranas y hasta muerte celular, por lo que constituye uno de los principales parámetros a considerar al evaluar el nivel de estrés oxidativo, tanto en hongos como en otros organismos (Edlich y Lyr, 1992; Marnett, 2002).

De acuerdo a estos reportes, en este estudio, dentro de la evaluación del efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en el grado de estrés oxidativo de *B. cinerea*, se consideró la determinación de los siguientes parámetros: niveles de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lipoperoxidación de membranas y actividad de enzimas antioxidantes. El ensayo consistió en incubar durante 6 o 48 horas a 22° C, micelio pre-crecido del patógeno en medio extracto malta-levadura líquido suplementado con el extracto o el solvente como control.

## 4.4.3.1 Contenido de peróxido de hidrógeno

Para evaluar el efecto del extracto en la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), se cuantificó el contenido del radical en el micelio y en el medio extracelular de cultivos de B. cinerea. Los resultados indicaron que la presencia de  $H_2O_2$ , tanto en los cultivos tratados con el extracto como en los cultivos control, sólo fue detectable en el medio de incubación del patógeno, y que la concentración del radical aumentó significativamente con el tiempo de incubación (Figura 24). Por otra parte, los resultados muestran que el contenido de  $H_2O_2$  en el medio de incubación a las 6 horas de incubación, incrementó en forma significativa y dosisdependiente por efecto del extracto en porcentajes que alcanzaron un 145 y 220% con la dosis de 250 y 500  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Sin embargo, a las 48 horas de incubación el contenido del radical en los cultivos tratados y el control, no fue significativamente diferente ( $p \le 0.05$ ).



**Figura 24.** Efecto del extracto etanólico de quillay *in vitro* en el contenido de  $H_2O_2$  en el medio de incubación de *B. cinerea* Pers. El hongo fue incubado por 6 o 48 horas en medio de cultivo suplementado con el extracto o el solvente como control. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos  $\pm$  DE. Letras diferentes indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

Una serie de enzimas antioxidantes estarían involucradas en la mantención del equilibrio entre la producción y remoción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *B. cinerea*, entre las cuales destacan catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasas (Gil-ad *et al.*, 2001). En este contexto, el incremento en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detectado a las 6 horas de incubación por efecto del extracto, podría responder a la capacidad del mismo de reducir la actividad CAT y de peroxidasas, enzimas que catalizan la degradación de este radical (Monget *et al.*, 1986; Levieux y Levieux, 1991; Gil-ad *et al.*, 2001). Por otro lado, si bien el extracto a las 6 horas de incubación provocó un aumento en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a las 48 horas la producción del radical en los cultivos tratados con el extracto no fue diferente de la detecta en el control, lo que permite inferir que el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> habría sido utilizado en la Reacción de Fenton para la producción de radicales hidroxilo (OH) (Marnett, 2002), o bien, que la cantidad del radical se mantendría relativamente similar a la del cultivo control, en respuesta a una menor actividad SOD en los cultivos tratados a las 48 horas de incubación, considerando que esta enzima cataliza la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Monget *et al.*, 1986; Levieux y Levieux, 1991; Gil-ad y mayer, 1999; Gil-ad *et al.*, 2001).

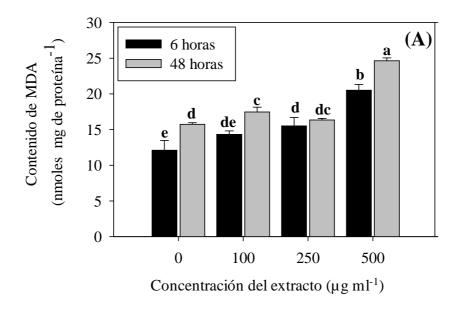
### 4.4.3.2 Lipoperoxidación de membranas

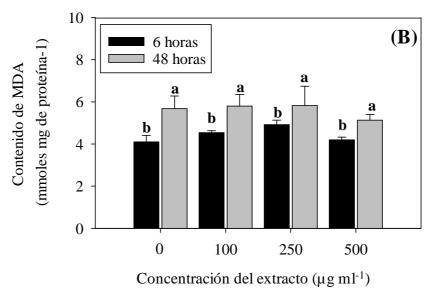
En este estudio se determinó el nivel de malonildialdehído (MDA) producido por el hongo, como una estimación del nivel de peroxidación lipídica. Considerando que el MDA es una molécula relativamente pequeña con dos grupos aldehído y soluble en agua, esta sería liberada desde el micelio al medio extracelular en caso de que la membrana plasmática se encuentre dañada o alternada en su permeabilidad (Choi *et al.*, 1996), fenómeno que ha sido observado en tejido vegetal sometido a lipoperoxidación (Steward y Bewley, 1980; Keyton *et al.*, 1985). En base a ésto, y considerando que el extracto de brotes *in vitro* de quillay, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, sería capaz de alterar en cierto grado la permeabilidad de la membrana plasmática de *B. cinerea* (resultados discutidos en *4.4.2*), en este estudio se determinó el contenido de MDA, tanto en el micelio como en el medio de incubación.

La Figura 25 muestra el contenido de MDA en el medio de incubación y en el micelio de *B. cinerea*, luego de 6 y 48 horas de incubación del patógeno, en presencia del extracto en estudio o el solvente como control.

Los resultados indicaron que el contenido de MDA en el medio de incubación aumentó significativamente con respecto al control por efecto del extracto ( $p \le 0.05$ ). Los porcentajes de incremento, a las 6 horas de incubación fueron de 18, 28 y 70%, mientras a las 48 horas alcanzaron valores de 10, 3 y 50%, con las concentraciones de 100, 250 y 500 µg ml<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 25A). Por otro lado, el contenido de MDA a nivel de micelio en los cultivos tratados con el extracto, en ambos tiempos de incubación, no varió significativamente con respecto al control ( $p \le 0.05$ ) (Figura 25B).

Es importante mencionar que en los cultivos control, tratados con etanol (85% v/v) en una concentración final que no afectaría el crecimiento del patógeno, se detectó un cierto nivel de MDA (Figura 25). Esto se debería a que, como se destacó anteriormente, la generación de EROs bajo condiciones normales de crecimiento ocurre, sin embargo, el nivel de producción es menor y sus efectos a nivel celular son leves debido a la eficiencia de los sistemas de defensa antioxidantes (Fridovich, 1978; Imloy y Linn, 1988; Ayar-Kayali y Tarhan, 2004)





**Figura 25.** Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la producción de malonildialdehído (MDA) en *B. cinerea* Pers. (A) Contenido de MDA en el medio de incubación; (B) Contenido de MDA en el micelio. El extracto fue evaluado en concetraciones finales de 100, 250 y 500 µg ml<sup>-1</sup>. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos  $\pm$  DE. Letras diferentes indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

Lo resultados además indicaron que el contenido de MDA en el medio de incubación fue superior (2 veces aprox.) al detectado a nivel de micelio (Figura 25). Esto concuerda con lo reportado en un trabajo realizado por Choi *et al.* (1996), en el que se evaluó el efecto del fungicida Vinclozolin (dicarboximida) en la lipoperoxidación de membranas e integridad de membrana de *B. cinerea*, en el cual se detectó la mayor parte de MDA en el medio de incubación, fenómeno que fue asociado a una alteración a nivel de membrana plasmática. Resultados del mismo estudio además mostraron que el efecto del fungicida en la membrana, se debería al efecto de la lipoperoxidación, más que a un proceso fisiológico (Choi *et al.*, 1996). De hecho, se ha reportado que la lipoperoxidación de membranas constituye una de las principales causas del efecto fungitóxico de dicarboximidas (vinclozolin, iprodione y procyamidone) (Lyr y Edlich, 1986; Edlich *et al.*, 1988; Edlich *et al.*, 1989; Edlich y Lyr, 1992, 1995; Steel y Fair, 1993; Choi *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998).

En base a tales reportes y los resultados obtenidos en este estudio, es posible inferir que el extracto etanólico en estudio provoca lipoperoxidación de membranas en *B. cinerea*, sin embargo este efecto sólo fue detectado mediante la determinación del contenido de MDA en el medio de incubación, ya que las moléculas de MDA, posiblemente producto de la misma lipoperoxidación habrían sido liberadas desde el micelio al medio extracelular, lo que explicaría, al menos en parte, la alteración en la permeabilidad de la membrana del patógeno por efecto del extracto (resultados discutidos en *4.4.2*).

Lagos (2003), demostró que el fungicida comercial iprodione, a una concentración de 40 μg ml<sup>-1</sup> y bajo una metodología muy similar a la utilizada en este ensayo, incrementó 2,4 veces la producción de MDA en el micelio de *B. cinerea*. De acuerdo a ésto, el efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en los niveles de lipoperoxidación de membranas en *B. cinerea*, fue mas bien bajo, por lo que no constituiría su principal mecanismo de acción.

### 4.4.3.3 Actividad de enzimas antioxidantes

En este estudio se evaluó el efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la actividad guaiacol peroxidasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) de *B. cinerea*.

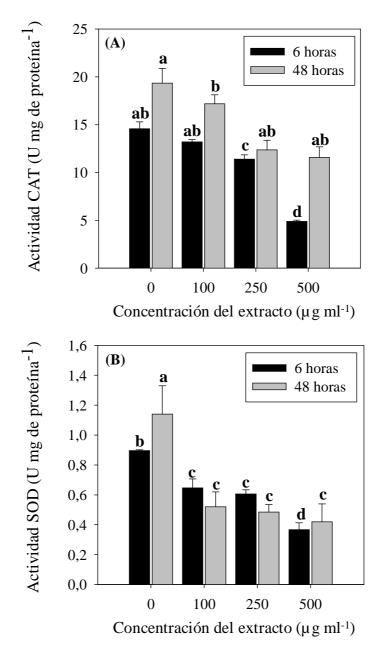
Cabe destacar, que bajo las condiciones de este ensayo no se detectó actividad peroxidasa (POD y APX) en el micelio de *B. cinerea*, tanto en los cultivos tratados con el extracto de quillay como en el control, lo que concuerda con lo reportado en un trabajo realizado por Malolepsza (2004), en el cual se evaluó el efecto de la hidroxietilorutina en la actividad oxidante-antioxidante de *B. cinerea*.

La Figura 26, muestra la actividad CAT y SOD en cultivos de *B. cinerea* incubados durante 6 y 48 horas, con el extracto en estudio en diferentes concentraciones o el solvente como control.

Los resultados indicaron que la actividad CAT (Figura 26A), en ambos tiempos de incubación, fue significativamente reducida por acción del extracto con respecto al control. El efecto observado fue dosis dependiente, alcanzando porcentajes de disminución de 10, 22 y 66% a las 6 horas de incubación, y de 22, 36 y 40% a las 48 horas de incubación, con el extracto en concentración de 100, 250 y 500 µg ml<sup>-1</sup>, respectivamente.

En la Figura 26B, se muestran los resultados del efecto del extracto en la actividad SOD, los cuales indican que la actividad de esta enzima también fue significativamente dismunuida en los cultivos tratados con el extracto en relación al control, en ambos tiempos de incubación. Los porcentajes de inhibición, a las 6 horas de incubación alcanzaron valores cercanos al 30% con las concentraciones de 100 y 250 µg ml<sup>-1</sup>, y de 60% con la concentración de 500 µg ml<sup>-1</sup>, mientras a las 48 horas de incubación, éstos fueron de hasta un 60%, sin existir diferencias significativas entre las diferentes concentraciones evaluadas.

Los resultados obtenidos en este ensayo permiten inferir que, la menor actividad CAT detectada a las 6 horas de incubación por efecto del extracto (250 y 500 µg ml<sup>-1</sup>), considerando que esta enzima utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato (Liochev y Fridovich, 1994; Ayar-Kayali y Tarhan, 2004; Chauhan *et al.*, 2006; Enjalbert *et al.*, 2007), explicaría el mayor contenido de este radical con respecto al control en los cultivos tratados con el extracto en el mismo tiempo de incubación (resultados discutidos en *4.4.3.1*).



**Figura 26.** Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la actividad de enzimas antioxidantes de *B. cinerea* Pers. El hongo fue incubado a 22° C en medio líquido extracto malta-levadura suplementado con el extracto en diferentes concentraciones (100, 250 y 500 µg ml<sup>-1</sup>) o el solvente como control, durante 6 y 48 horas. (A) Actividad catalasa (CAT); (B) Actividad superóxido dismutasa (SOD). Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos  $\pm$  DE. Letras diferentes en las barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

Por otra parte, los resultados mostraron que el efecto del extracto en estudio en la disminución de la actividad SOD, fue mayor a las 48 horas de incubación (60% de disminución), lo que explicaría el hecho de que en este tiempo de incubación no se haya observado un aumento en los contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los cultivos tratados con el extracto, como se detectó a las 6 horas de incubación, lo cual además se debería a que a las 48 horas de incubación, la velocidad de producción del radical superaría a la velocidad de su degradación, ya que los niveles de disminución de la actividad CAT por efecto del extracto, fueron menores a los detectados para SOD e inferiores a los observados a las 6 horas de incubación.

Se ha reportado que el mecanismo de resistencia de *B. cinerea* a dicarboximidas estaría asociado con un sistema de atrapamiento de radicales libres y lípidos radicales, por lo que el sistema de enzimas antioxidantes contribuiría al desarrollo de resistencia en el patógeno a tales fungicidas (Eldich *et al.*, 1988; Edlich y Lyr, 1992; Steel y Fair, 1993). En el mismo contexto, estudios han demostrado que asilados resistentes a dicarboximidas de *B. cinerea* exhibirían una mayor actividad CAT con respecto a asilados susceptibles (Eldich *et al.*, 1988; Edlich y Lyr, 1992; Choi *et al.*, 1996). De acuerdo a estos reportes y los resultados obtenidos en este estudio, el uso del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay como fungicida comercial, no contribuiría al desarrollo de resistencia a dicarboximidas en *B. cinerea*.

Los resultados de la evaluación del efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en el grado de estrés oxidativo de *B. cinerea* permiten concluir que, si bien el extracto en estudio es capaz de incrementar en forma moderada los niveles de peróxido de hidrógeno y disminuir la actividad de enzimas antioxidantes (CAT y SOD) en el patógeno, éste no provocaría un estrés oxidativo de gran magnitud en el hongo, ya que los niveles de lipoperoxidación de membranas no se vieron incrementados en forma importante por efecto del mismo.

# 4.4.4. Producción y actividad in vitro de enzimas involucradas en la patogénesis

La infección exitosa del tejido vegetal por *B. cinerea* requiere, entre otros aspectos, la acción coordinada de enzimas involucradas en el proceso de patogénesis (Staples y Mayer, 1995; Manteau *et al.*, 2003). En este contexto, la inhibición de la producción y/o actividad de tales

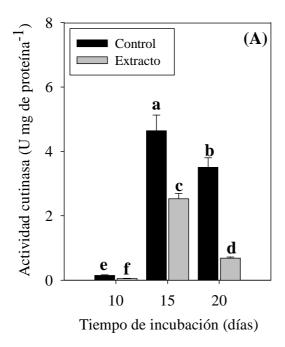
enzimas constituye un interesante mecanismo de acción para fungicidas orientados al control de este patógeno. En base a ésto, en este estudio se evaluó el efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la producción y actividad *in vitro* de cutinasa, poligalacturonasa (PG) y lacasa en *B. cinerea*.

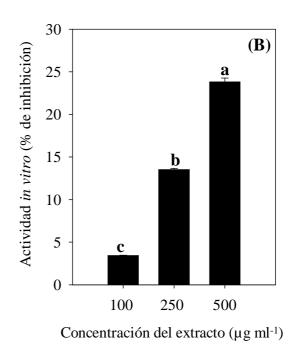
# 4.4.4.1 Cutinasa (*p*-nitrofenil butirato esterasa)

Considerando que la totalidad de las cutinasas purificadas desde hongos exhiben actividad esteresa (Huang y Kúc, 1995), en este estudio la actividad cutinasa de *B. cinerea* se determinó utilizando el sustrato modelo *p*-nitrofenil butirato (PNB), ya que estudios han demostrado que la hidrólisis de *p*-nitrofenil butirato a *p*-nitrofenol por *p*-nitrofenil butirato esterasas constituiría un sistema simple y exacto para la cuantificación de la actividad cutinasa potencial en este hongo (Salinas *et al.*, 1986; van der Vlugt Bergmans *et al.*, 1997)

En la Figura 27, se muestra el efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la producción y actividad *in vitro* de la enzima cutinasa (*p*-nitrofenil butirato esterasa) en cultivos de *B. cinerea*, suplementados con cutina de tomate como fuente de carbono. Los resultados indicaron que la actividad de esta enzima, determinada en el medio de incubación del patógeno (Figura 27A), fue detectada a partir del décimo día de incubación, alcanzando un máximo a los 15 días. Previamente se ha reportado que una serie de hongos fitopatógenos, incluyendo *B. cinerea* (Salinas *et al.* 1986), producen cutinasas en medio de cultivo líquido utilizando cutina como única fuente de carbono (Shishiyama *et al.*, 1970; Baker y Bateman, 1978; Kolattukudy *et al.*, 1981; Dickman *et al.*, 1982; Kolattukudy, 1984; Kolattukudy, 1987; Bonnen y Hammerschrnidt, 1989; Köller y Parker, 1989; Huang y Kúc, 1995)

Los resultados indicaron además que, en la presencia del extracto de quillay (250 µg ml<sup>-1</sup>), la producción de la enzima disminuyó en forma significativa con respecto al control, con niveles de inhibición que alcanzaron valores de 66, 45 y 80% a los 10, 15 y 20 días de incubación, respectivamente (Figura 27A). Por otro lado, el extracto, en concentraciones de 100, 250 y 500 µg ml<sup>-1</sup>, redujo significativamente y en forma dosis dependiente la actividad *in vitro* de la enzima, sin embargo, los porcentajes de inhibición sólo alcanzaron un 25% por efecto de la concentración más alta (500 µg ml<sup>-1</sup>) (Figura 26B)





**Figure 27.** Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la producción y actividad *in vitro* de cutinasa en *B. cinerea* Pers. (A) Actividad cutinasa detectada en el medio de incubación. El extracto fue evaluado en una concentración de 250 μg ml<sup>-1</sup>. (B) Porcentage de inhibición de la actividad cutinasa *in vitro*. El extracto fue evaluado en concentraciones finales de 100, 250 y 500 μg ml<sup>-1</sup>. Como control se utilizó el solvente. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE. Letras diferentes en las barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

Estudios previos han reportado que una serie de productos naturales de plantas, metabolitos microbiales y fungicidas, son capaces de inhibir la actividad, producción y/o secreción de cutinasas en hongos fitopatógenos (Sisler, 1986; Köller et al., 1982 a, b y c; Köller et al., 1990; Miura et al., 1994; Köller et al., 1995; Francis et al., 1996; Bostock et al., 1999). En este contexto, Bostock et al. (1999) demostraron que la producción de cutinasa en el hongo Monilinia fructicola fue suprimida por los ácidos clorogénico y caféico, y una serie de ácidos cinámicos y benzoicos con diferentes grados de hidroxilación y metoxilación en el anillo aromático, siendo éstos los principales metabolitos fenólicos en la epidermis de frutos de durazno (Prunus persicae L. Bastch), los cuales se encuentran en concentraciones

especialmente altas en genotipos resistentes a este hongo. En el mismo estudio se demostró que el ácido caféico además fue capaz de reducir en forma significativa la actividad de esta enzima en B. cinerea. Por otro lado, se ha reportado que las ebelactonas, metabolitos relacionados estructuralmente a las β-lactonas micólicas sintetizadas en actinomicetes, actúan como potentes inhibidores de cutinasas producidas por hongos fitopatógenos (Köller et al., 1990; Köller et al., 1995). Tales metabolitos han mostrado inhibir la actividad de una cutinasa extracelular del hongo Pyrenopeziza brassicae, afectando en alto grado la capacidad infectiva del patógeno en hojas de B. napus (Davies et al., 2000). Además, las ebelactonas inhiben la actividad esterasa en Venturia inaequalis (Köller et al., 1991) y cutinasas en Rhizoctonia solani (Chun et al., 1995). Köller et al. (1982c), demostraron que una cutinasa purificada desde Fusarium solani f. sp. pisi, fue efectivamente inhibida por el fungicida benomyl a través de la reacción del *n*-butilisocianato (producto de degradación de benomyl) con la serina activa de la enzima, reduciendo la habilidad patogénica del hongo. Además, se ha reportado que los fungicidas organofosforados IBP (Kitazin) y edifenfos (Hinosan), previenen la infección en plantas por hongos mediante la inhibición de la actividad de cutinasas (Sisler, 1986). Por otro lado, se ha demostrado que la mepanipirima (fungicida- anilinopirimidina) no inhibe la actividad de enzimas que degradan la pared celular en B. cinerea, sin embargo, previene la secreción de las mismas, incluyendo cutinasas, fenómeno que provocaría una disminución de la capacidad infectiva del patógeno (Miura et al., 1994). Inhibidores de cutinasas además han mostrado afectar la virulencia de los hongos Colletotrichum gloesporioides (Dickman et al., 1983), Alternaria alternata, Ascochita pinoides y Ascochita pisi (Köller et al., 1983) y Erysiphe graminis f.sp. hordei (Francis et al., 1996)

Además de inhibidores de cutinasas, la utilización de anticuerpos específicos para estas enzimas han demostrando el rol de las mismas en la penetración cuticular de hongos fitopatógenos en el tejido hospedero (Köller *et al.*, 1995; Malti y Kolattukudy, 1979). En este contexto, Comménil *et al.* (1993) identificaron una lipasa excretada por *B. cinerea*, la cual exhibió una alta actividad cutinolítica, y demostraron que el uso de anticuerpos policionales anti-lipasas suprimió la habilidad de hongo de infectar hojas de tomate.

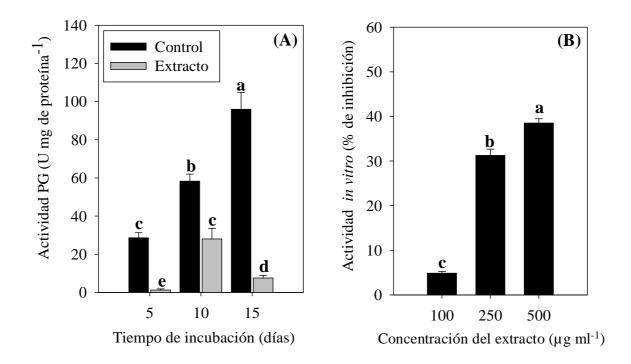
En base a estos reportes y los resultados obtenidos, es posible concluir que el extracto en estudio inhibe significativamente la producción de cutinasa en *B. cinerea*, lo que probablemente se traduciría en una reducción de la capacidad infectiva del patógeno en condiciones *in vivo*, hecho que explicaría, al menos en parte, el menor desarrollo del hongo en hojas de tomate y frutos de frutilla tratados con el extracto (resultados discutidos en 4.3). Por otra parte, considerando que el efecto del extracto en la actividad ezimática *in vitro* fue mas bien bajo, es posible inferir que la disminución en la producción de la enzima por efecto del extracto (Figura 27A), respondería a una inhibición en el nivel de la síntesis de la misma, más que a un efecto directo del extracto en la actividad de la enzima.

### 4.4.4.2 Poligalacturonasa

Se ha demostrado que las poligalacturonasas (PGs) de *B. cinerea*, producidas generalmente en las etapas iniciales del proceso de infección (Johnston y Williamson, 1992 a y b; De Lorenzo *et al.*, 2001; De Lorenzo y Ferrari, 2002; D'Ovidio *et al.*, 2004), participan en la maceración del tejido vegetal y que son primordiales para el desarrollo de los síntomas de pudrición, actuando como factores de virulencia en la infección por el patógeno (Staples y Mayer, 1995). Debido a estas razones, en este estudio se consideró interesante evaluar el efecto del extracto en estudio en la producción y actividad *in vitro* de PG en *B. cinerea*.

En la Figura 28, se muestra la producción y actividad *in vitro* de la enzima en cultivos de *B. cinerea* incubados en medio de cultivo suplementado con pectina como fuente de carbono, en presencia del extracto etanólico de brotes *in vitro* quillay o el solvente como control, durante 5, 10 y 15 días.

Los resultados indicaron que la actividad de esta enzima fue detectada en los cultivos fúngicos a partir de los 5 días de incubación e incrementó a medida que el tiempo de incubación fue mayor (Figura 28A). De igual forma que lo ocurrido con la enzima cutinasa, la producción de PG fue reducida significativamente por efecto de extracto en todos los tiempos de incubación evaluados. Los porcentajes de inhibición alcanzaron valores de 95, 51 y 92% al día 5, 10 y 15 de incubación, respectivamente (Figura 28A).



**Figura 28.** Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la producción y actividad *in vitro* de poligalacturonasa en *B. cinerea* Pers. (A) Actividad enzimática producida en medio de cultivo mínimo suplementado con pectina como fuente de carbono. El extracto fue evaluado en una concentración de 250 μg ml<sup>-1</sup>. (B) Porcentage de inhibición de la actividad *in vitro*. El extracto fue evaluado en concentraciones finales de 100, 250 y 500 μg ml<sup>-1</sup>. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE. Letras diferentes indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey,  $\leq$  0,05).

La Figura 28 B, muestra el efecto del extracto en la actividad *in vitro* de PG. Los resultados muestran que el extracto disminuyó la actividad *in vitro* de la enzima, causando una inhibición de hasta un 39% por efecto de la mayor concentración (500 µg ml<sup>-1</sup>). Debido a que el efecto del extracto en la actividad ezimática *in vitro*, al igual que lo ocurrido con la enzima cutinasa, fue mas bien leve, es posible postular que el efecto de éste en la producción de la enzima en el tiempo (Figura 28 A), se debería probablemente a una disminución en la síntesis de la misma.

Se ha reportado que las plantas producen una serie de inhibidores de poligalacturonasas, los cuales estarían involucrados en la interacción parásito-hospedero durante el proceso de infección de hongos patógenos en plantas (Ben-Hod et al., 1997), dentro de los que destacan compuestos de origen fenólico, policétidos y proteínas (Abu-Goukh y Labavitch, 1983; Abu-Goukh et al. 1983; Friend, 1977; Nuss et al., 1996; Johnston et al., 1993; Johnston et al., 1994; Gao y Shain, 1995). En este contexto, estudios han demostrado que algunos compuestos fenólicos y sus productos de oxidación son capaces de inhibir PGs en hongos fitopatógenos (Friend, 1977). La actividad PG del hongo Aspergillus niger fue inhibida por extractos de una planta parásita del género Orobanche debido a la presencia de ésteres del ácido caféico en el extracto (Ben-Hod et al., 1997). Por otro lado, Bostock et al. (1999) reportaron que el ácido caféico inhibe la actividad de una poligalacturonasa producida por M. fructicola. Taninos aislados de la corteza de Castanea dentata (Marshall) Borkh (castaño americano) y Castanea mollissima Blume (castaño chino), inhiben una PG purificada desde una cepa virulenta de Cryphonectria parasitica, agente causal del pardiamiento de la corteza interna del castaño americano, los cuales además fueron activos en una PG del patógeno Cryphonectria lindemuthianum. El alto nivel de estos compuestos en hospederos resistentes, permitió a los autores sugerir que la enzima PG constituiría un factor de virulencia en C. parasitica y que su inhibición podría contribuir al desarrollo de resistencia en castaño Chino (Gao y Shain, 1995).

Por otra parte, se ha reportado que las plantas sintetizan a nivel de la pared celular proteínas que inhiben la actividad hidrolítica de PG (PGIPs), limitando la colonización por hongos en el tejido vegetal (De Lorenzo *et al.*, 2001; De Lorenzo y Ferrari, 2002) y que los niveles de PGIPs se correlacionarían positivamente con un incremento en la resistencia de plantas a ciertos hongos patógenos (Abu-Goukh *et al.*, 1983; Salvi *et al.*, 1990; Bailey *et al.*, 1992; Johnston *et al.*, 1993; D'Ovidio *et al.*, 2004). Evidencia directa del rol de PG en la capacidad infectiva de hongos en plantas ha sido obtenida recientemente mediante el uso de plantas transgénicas transformadas con genes *pgip*. De esta forma, plantas de tomate sobreexpresando el gen *pgip* mostraron una reducción significativa de la susceptibilidad a la infección por *B. cinerea* (Powell *et al.*, 2000; D'Ovidio *et al.*, 2004). Además, estudios han demostrado que la presencia de proteínas capaces de inhibir poligalacturonasas en berries inmaduros, explicaría la resistencia de los frutos a la infección por este patógeno (Grassin, 1987).

De acuerdo a éstos reportes y los resultados obtenidos en este estudio, es posible inferir que el efecto inhibitorio del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en el desarrollo fúngico de *B. cinerea* en condiciones *in vivo*, respondería en parte, a la capacidad del mismo de reducir la producción de poligalacturonasa en el patógeno.

### 4.4.4.3 Lacasa

Se ha documentado ampliamente que las enzimas del tipo lacasa en hongos fitopatógenos exhiben una amplia especificidad de sustratos, por lo que han sido implicadas en diferentes oxidaciones bioquímicas, incluyendo actividad lignolítica (Xu *et al.*, 1997), oxidación de fenoles y polimerización (Billal y Thurston, 1996; Dubernet *et al.*, 1977).

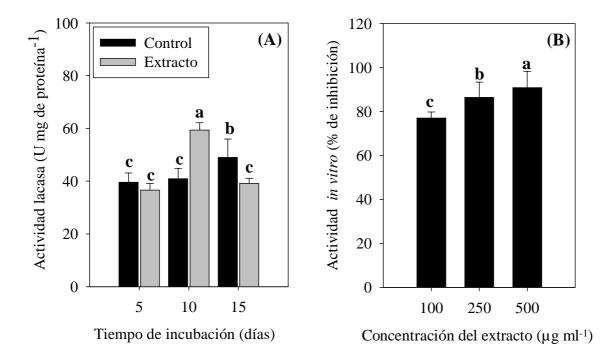
Un aspecto importante del ataque por *B. cinerea* en vides, es que este patógeno perjudica en gran medida la calidad de los mostos y del vino (Suárez e Iñigo, 1990; Piva y Di Pillo, 1994). En los mostos, el hongo es capaz de producir degradación de azúcares, modificación de los equilibrios ácidos, la formación de glicerol y algunos polisacáridos, y degradación de compuestos nitrogenados (Joyeux *et al.*, 1984; Piva y Di Pillo, 1994; Urbano, 2005). Además, este hongo produce un metabolito antifúngico que inhibe el crecimiento de levaduras (botriticina), por lo que con frecuencia detiene la fermentación antes de que el vino haya acumulado niveles suficientes de alcohol (Dubourdieu *et al.*, 1978; Donèche, 1993). Por otro lado, se ha reportado que vinos producidos con uvas infectadas por botritis, exhiben un incremento importante de la actividad de polifenoloxidasas, tales como lacasas y tirosinasas (Piva y Di Pillo, 1994; Urbano, 2005). Debido a ésto, en el vino, las alteraciones generadas por este hongo afectan drásticamente en el sabor y color, provocan la desaparición de aromas afrutados (Piva y Di Pillo, 1994) y limitan sus posibilidades de conservación (Pearson y Goheen, 1988; Suárez e Iñigo, 1990; Piva y Di Pillo, 1994; Bouquet *et al.*, 1995 y 1996; Gerland, 2006).

Las lacasas de *B. cinerea* se caracterizan por ser resistentes al alcohol y muy estables, permaneciendo activas en las viñas durante meses (Piva y Di Pillo, 1994). Esta enzima produce una degradación irreversible de los polifenoles, particularmente de los taninos, responsables de la astringencia y cuerpo del vino, y de los antocianos, responsables del color,

lo que redunda en la oxidación del vino en la barrica, y además modifica la composición fenólica de la uva resultando vinos con un olor desagradable (Pearson y Goheen, 1988; Suárez e Iñigo, 1990; Piva y Di Pillo, 1994; Gerland, 2006). Debido a ésto, en aquellas zonas agroclimáticas donde predomine la pudrición por botritis en vides se vuelve fundamental implementar programas de control basados en el uso de botriticidas (Latorre, 1986; Latorre y Vásquez, 1996). Estudios han demostrado que los fungicidas sintéticos en base a pyrimethanil, bloquean la producción de lacasas (Milling y Richardson, 1995; Miura *et al.*, 1994; Rosslenbroich y Stuebler, 2000), sin embargo, actualmente no existen disponibles en el mercado fungicidas naturales capaces de inhibir la actividad de esta enzima en *B. cinerea*.

Por otro lado, el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), es sin lugar a dudas el aditivo más ampliamente utilizado en vinificación y también el más indispensable. Su acción antioxidante (Poulton, 1970; Windenradt y Singleton, 1974; Ough y Crowell, 1987), antioxidásica (Dubernet y Ribéreau, 1973; Amano *et al.*, 1979; Sayavedra y Montgomery, 1986) y antimicrobiana (Lafon y Peynaud, 1974; Beech *et al.*, 1979; Romano y Suzzi, 1993), lo convierten en una herramienta prácticamente imprescindible en la elaboración de vinos (Schroeter, 1966). Se ha reportado que la correcta utilización del SO<sub>2</sub> permite obtener vinos menos oxidados, dotados de un mejor color y aroma, y sin lugar a dudas con una menor acidez volátil (Zamora, 2005). Sin embargo, una de las importantes razones por las cuales se añade este aditivo al mosto, es evitar la acción de polifenoloxidasas (Flancy, 1998; Ribéreau-Gayón *et al.*, 1998). No obstante este tratamiento es útil para disminuir la actividad de algunas de estas enzimas, ha mostrado ser inefectivo en la inhibición de lacasas (Dubernet y Ribéreau, 1973; Urbano *et al.*, 2005; Zamora, 2005).

De acuerdo a estos reportes, se consideró interesante evaluar como un posible mecanismo de acción de la actividad antifúngica del extracto en estudio en *B. cinerea*, el efecto de éste en la producción y/o actividad de la enzima lacasa. En la Figura 29, se muestra la producción y actividad *in vitro* de la enzima lacasa determinada en el medio de incubación de cultivos de *B. cinerea* suplementados con pectina como inductor, incubados en presencia del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay o el solvente como control, durante 5, 10 y 15 días.



**Figura 29**. Efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay en la producción y actividad *in vitro* de lacasa en *B. cinerea* Pers. (A) Actividad enzimática cuantificada en el medio de incubación. El extracto fue evaluado en una concentración de 250 μg ml<sup>-1</sup>. (B) Porcentage de inhibición de la actividad *in vitro* de PG. El extracto fue evaluado en concentraciones finales de 100, 250 y 500 μg ml<sup>-1</sup>. Como control se utilizó el solvente. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE. Letras diferentes indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

Los resultados indicaron que la actividad lacasa fue detectada en los cultivos fúngicos, al igual que lo ocurrido con la enzima PG, a partir de los 5 días de incubación e incrementó a medida que el tiempo de incubación fue mayor (Figura 29A). Al quinto día de incubación la actividad lacasa en los cultivos tratados con el extracto no difirió significativamente de la detectada en los cultivos control, no obstante, al día 10 la actividad de esta enzima en incrementó en un 50% por efecto del extracto con respecto al control. La estimulación de la producción de lacasa en *B. cinerea* por productos naturales de plantas, ha sido reportada previamente (Marbach *et al.*, 1985; Cotoras *et al.*, 2004). En este contexto, la producción de lacasa fue inducida en cultivos de *B. cinerea* suplementados con ácido caféico o pectina (Marbach *et al.*, 1985) y el ácido 3β-hidroxikaurenóico (Cotoras *et al.*, 2004)

Los resultados además mostraron que, al día 15 de incubación, en el cual se detectó el mayor nivel de actividad enzimática, la producción de la enzima disminuyó en un 21% en los cultivos tratados con el extracto con respecto al control (Figura 29A).

El extracto en estudio además redujo en forma significativa la actividad *in vitro* de la enzima. El efecto inhibitorio fue dosis dependiente, alcanzando porcentajes de inhibición de 77, 86 y 91% con las concentraciones de 100, 250 y 500 µg ml<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 29B). De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible inferir que, a diferencia de lo ocurrido con las otras enzimas evaluadas, la reducción de la actividad lacasa de *B. cinerea* por efecto del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay, respondería a un efecto directo de éste en la actividad de la enzima.

Goetz *et al.* (1999), demostraron que una serie de compuestos fenólicos (fenoles y catecoles) presentes en bayas sanas de uvas, tales como catequina, epicatequina 3-*O*-galato, ácido *p*-cumárico, ácido *cis*-coutárico, ácido *trans*-caftárico, taxifolina 3-*O*-ramnosido y quercetina 3-*O*-glucuronido, fueron identificados como fuertes inhibidores de la actividad estilbeno oxidasa en *B. cinerea* (Gunata *et al.*, 1987; Pezet y Pont, 1992; Pezet, 1998; Goetz *et al.*, 1999), uno de los tipos de lacasas producidas en este patógeno (Pezet, 1998), las cuales actuarían en la detoxificación de estilbenos sintetizados en uvas (Pezet *et al.*, 1991). Con el propósito de comparar cuantitativamente estos compuestos, en el mismo estudio se analizó extractos fenólicos de dos variedades de uvas con diferentes grados de susceptibilidad a *B. cinerea* (Gamay y Gamaret) (Goetz *et al.*, 1999). Los resultados permitieron concluir que la inhibición de la actividad estilbeno oxidasa de *B. cinerea* por estos metabolitos, contribuiría al desarrollo de resistencia en bayas jóvenes de uvas al ataque por este patógeno (Goetz *et al.*, 1999)

Una serie de estudios han demostrado la importancia de la enzima lacasa en la capacidad infectiva de *B. cinerea* (Bar-Nun *et al.*, 1988 y 1989; Bar-Nun y Mayer, 1988 y 1989; Staples y Mayer, 1995; Viterbo *et al.*, 1993; 1994). En este contexto, Bar-Nun *et al.* (1988) demostraron que el tratamiento de cultivos de *B. cinerea* con EDTA (ácido etilendiamino tetraacético), no afectó el crecimiento del hongo, sin embargo, el tratamiento de frutos de pepino con este quelante, redujó el nivel de infección y previno la formación de lacasa

(Staples y Mayer, 1995.). Por otro lado, se ha reportado que frutos de pepino (Cucumis prophetarum L.) y de la maleza pepinillo del diablo (Ecballium elaterium L.), sintetizan una familia de metabolitos triterpenoides cíclicos, las cucurbitacinas, los cuales los protegen de la infección por B. cinerea (Bar Nun et al., 1988; Bar-Nun y Mayer, 1989), y que la resistencia al patógeno en estas especies, se correlacionó positivamente con la capacidad de los extractos de reprimir la secreción de lacasas (Staples y Mayer, 1995). Tanto la cantidad de RNAm que codifica la síntesis de lacasa en este hongo, como la producción de la misma, fue marcadamente inhibida en cultivos de B. cinerea en la presencia de cucurbitacinas (Viterbo et al., 1993; Viterbo et al., 1994). La represión de la producción de lacasas por efecto de las cucurbitacinas, derivó en una reducción de la capacidad de infección de B. cinerea, lo cual confirmó la importancia de las lacasas en la virulencia de este patógeno (Bar-Nun et al., 1988; Staples y Mayer, 1995). De esta forma, la aplicación de extractos de E. elaterium o cucurbitacinas a frutos o plantas de pepino y hojas de zapallo, previo a la inoculación con B. cinerea, inhibió la infección del tejido por el patógeno (Bar-Nun y Mayer, 1990). Estas observaciones sugirieron que la formación de lacasa es un requerimiento necesario para la infección por botritis en plantas (Bar-Nun y Mayer, 1989), resultados que concuerdan con los descritos por Sbaghi et al. (1996), los cuales reportaron una dependencia entre los niveles de producción de lacasa y la capacidad infectiva de B. cinerea en uvas.

De acuerdo a lo expuesto, el extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay al reducir significativamente la actividad lacasa en *B. cinerea*, provocaría una disminución de la habilidad patogénica del hongo, lo cual explicaría el menor desarrollo del patógeno en condiciones *in vivo* a nivel de hojas y frutos.

Los resultados obtenidos en este estudio con la actividad lacasa son muy interesantes, ya que el extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay constituiría el primer reporte de un producto de origen botánico capaz de reducir efectivamente la actividad lacasa en *B. cinerea*.

### 4.5 Fraccionamiento del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay

### 4.5.1 Rendimiento de las fracciones obtenidas

Con el propósito de aislar fracciones activas, el extracto etanólico de quillay *in vitro* fue fraccionado mediante el uso de una placa filtrante, utilizando sistemas de solventes de polaridad ascendente. Como se muestra en la Tabla 6, el rendimiento de las fracciones fue incrementando con el aumento de la polaridad, lo que permite inferir que el extracto estaría constituido en gran parte por metabolitos polares, siendo F5 la fracción mayoritaria.

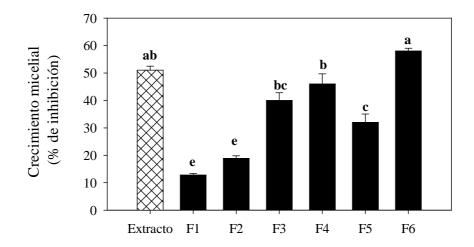
**Tabla 6.** Rendimiento de las fracciones del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay.

Fracciones	Sistema de solventes	Rendimiento (%)		
F1	n-hexano 100%	1,26		
F2	<i>n</i> -hexano : acetato de etilo (9:1)	2,58		
F3	<i>n</i> -hexano : acetato de etilo (5:5)	4,2		
F4	acetato de etilo	9,2 41,5		
F5	<i>n</i> -acetato de etilo : etanol (5:5)			
F6	etanol 100% 15,4			
Total		74,14		

## 4.5.2 Actividad antifúngica in vitro de las fracciones en B. cinerea

Se evaluó el efecto de soluciones hidroalcohólicas de cada fracción en el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*. Los resultados (Figura 30), indicaron que las fracciones más polares fueron las más activas, con porcentajes de inhibición de 40, 46, 32 y 48% para F3, F4, F5 y F6, respectivamente. No obstante, el efecto de ninguna de las fracciones superó la actividad fungitóxica del extracto crudo total (51% de inhibición), lo que podría responder a la presencia de un efecto sinérgico entre los componentes de las diferentes fracciones, tal y como se ha reportado para la actividad biológica de otros extractos y metabolitos de plantas (Tiap-Ling, 2004; Vidal *et al.*, 2006; Friedman, 2007). Este resultado es muy interesante, ya que plantea el

uso del extracto crudo de la especie en estudio como potencial fungicida, lo cual reduciría tanto el menor costo de obtención del producto, como el riesgo de desarrollo de resistencia en el patógeno.



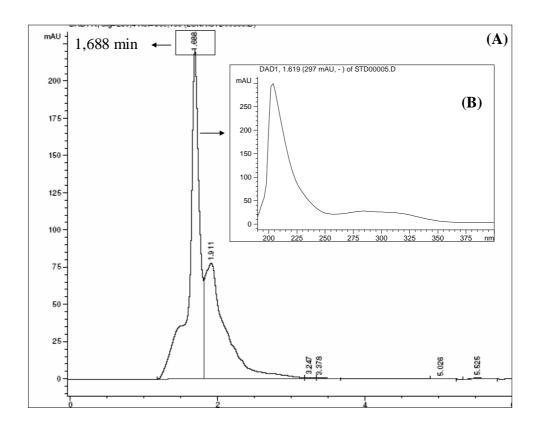
**Figura 30.** Efecto de soluciones del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay y las fracciones aisladas, en el crecimiento micelial de *B. cinerea* Pers. Las fracciones, al igual que el extracto crudo, fueron evaluadas en una concentración final de 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, utilizando etanol 85% v/v como solvente. F1 [n-hexano], F2 [n-hexano: acetato de etilo (9:1)], F3 [n-hexano: acetato de etilo (5:5)], F4 [acetato de etilo], F5 [acetato de etilo: etanol (5:5)] y F6 [etanol 100%]. Los porcentajes de inhibición fueron calculados al quinto día de incubación. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE. Letras diferentes en las barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

### 4.6 Compuestos antifúngicos en extractos de brotes in vitro de quillay

### 4.6.1 Contenido de saponinas en los extractos y fracciones activas

Como se ha destacado anteriormente, una serie de estudios han reportado que la actividad antifúngica de extractos de quillay, en condiciones naturales de crecimiento, respondería principalmente a la presencia de saponinas (Villegas, 1999, Apablaza *et al.*, 2002; Moya, 2003; Chapagain *et al.*, 2007), siendo éstos los metabolitos mayoritarios en la especie (Guo *et* 

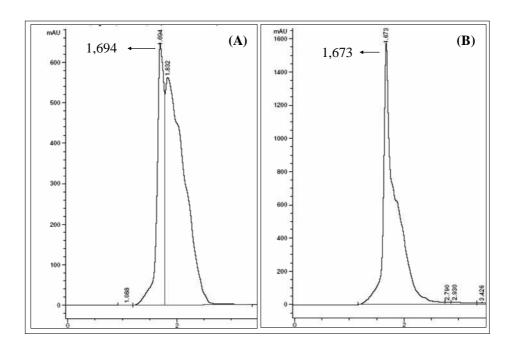
al., 2000; Nord y Kenne, 2000; Nord et al., 2001). Por otra parte, se ha demostrado que tejido vegetal cultivado in vitro es capaz de sintetizar metabolitos específicos en concentraciones similares que plantas intactas en condiciones in vivo (Calva-Calva et al., 2002; Vanisree et al., 2004). Tales reportes, permitieron inferir que posiblemente la presencia de saponinas en los extractos de brotes in vitro de quillay, explicaría, al menos en parte, la actividad fungitóxica de los mismos en B. cinerea. De acuerdo a ésto, en este estudio se determinó mediante análisis por HPLC el contenido de saponinas en los extractos de acuerdo al método empleado por Copaja et al. (2003) modificado, utilizando como estándar el producto comercial Quillaja Ultra Powder (QP UF 1000, Desert King Ldta.). En la Figura 31 se muestra el cromatograma de HPLC de una solución acuosa del producto utilizado como estándar.



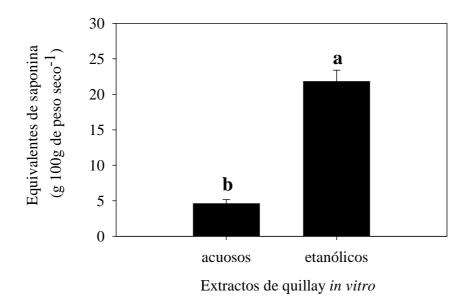
**Figura 31.** Cromatograma HPLC de una solución acuosa de Quillaja Ultra Powder. El análisis de las muestras (20  $\mu$ l) se llevo a cabo en un equipo HPLC con arreglo de diodo (Agilent 1100), en una columna RP-18 bajo condiciones isocráticas (MeOH:H<sub>2</sub>O = 90:10), a un flujo de 0,8 ml min<sup>-1</sup>. Las señales fueron detectadas a 230 nm (A) Cromatograma de la muestra; (B) Espectro UV del peak mayoritario.

De acuerdo a los análisis de las soluciones del estándar, las saponinas presentaron un pico con un tiempo de retención de  $1.6 \pm 0.2$  min (Figura 31A). Es importante destacar que, debido a que el producto utilizado como estándar (Quillaja Ultra Powder) corresponde a una mezcla de diferentes saponinas triterpénicas (San Martín y Briones, 2000), los cromatogramas obtenidos no mostraron una buena resolución, ya que el pico mayoritario fue bastante amplio y además aparecieron otros picos con tiempos de retención muy cercanos al del pico mayoritario. No obstante, tomando en cuenta que en este estudio se planteo identificar la estructura general del metabolito más que una saponina específica, se consideró apropiada la utilización de esta mezcla de saponinas como estándar. Por lo demás, la disponibilidad en el mercado de saponinas purificadas de quillay es baja, ya que el proceso de separación de estos metabolitos es altamente complicado y costoso, lo que responde a la alta complejidad y similitud estructural de la mezcla de saponinas en esta especie (Kensil *et al.*, 1991; van Setten *et al.*, 1995; Kite *et al.*, 2004)

En la Figura 32 A y B, se muestran los cromatogramas, obtenidos del análisis por HPLC para la detección de saponinas, de extractos de brotes in vitro de quillay. Los resultados muestran que tanto en extractos acuosos como etanólicos se detectó el pico que presenta coincidencia con el tiempo de retención y espectro UV del pico mayoritario del estándar. Este resultado es muy interesante, ya que constituye el primer reporte de que brotes de quillay obtenidos mediante cultivo in vitro son capaces de sintetizar estos metabolitos, lo que permite proponer al cultivo in vitro de plantas como una herramienta alternativa para la obtención de saponinas de quillay, sin arriesgar la preservación de esta especie nativa. Por otra parte, con el propósito de relacionar la actividad antifúngica de los extractos de brotes in vitro de quillay, con los niveles de saponinas, se determinó, mediante análisis de regresión lineal de las curvas de calibración del estándar (r= 0,998), el contenido de este metabolito en extractos acuosos y etanólicos. Los resultados (Figura 33), indicaron que el contenido de este metabolito en extractos etanólicos fue mayor al de extractos acuosos. En este contexto, se ha reportado que las saponinas, además de ser solubles en agua (Cuellar, 1983; Rodríguez, 1986) exhiben altos grados de solubilidad en soluciones de etanol 80 %, propiedad que se ha empleado en diversas técnicas para su extracción y purificación (Hernández, 1997; Uribe-Lamas, 1987; Martínez, 2001).



**Figura 32.** Cromatogramas, obtenidos del análisis por HPLC para la detección de saponinas, de extractos acuosos (A) y etanólicos (B) de brotes *in vitro* de quillay.



**Figura 33.** Equivalentes de saponina (g 100g peso seco<sup>-1</sup>) en extractos acuosos y etanólicos de brotes *in vitro* de quillay. Los extractos fueron evaluados en una concentración de 10% p/v. Cada barra representa el promedio de 3 repeticiones  $\pm$  DE. Letras diferentes en las barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

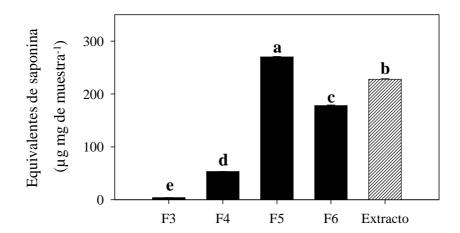
Como ya se ha destacado, el etanol en altas concentraciones posee la capacidad de alterar la integridad de las membranas celulares por deshidratación (Elvir, 1993), por lo que permitiría que moléculas almacenadas en organelos celulares en el tejido vegetal puedan ser liberadas durante el proceso de extracción. Por otra parte, se ha documentado que la mayor parte de las saponinas antifúngicas se encuentran en el tejido vegetal almacenadas a nivel de vacuolas u organelos en el tejido sano, principalmente a nivel de células epidérmicas (Grayer y Harborne, 1994; Osbourn, 1999 a y b; Morrissey y Osbourn, 1999; Dixon, 2001). Esto, podría explicar el hecho de que en este estudio el uso de etanol (85% v/v) como solvente, generó extractos con un mayor contenido de saponinas, en relación al detectado en extractos acuosos.

Por otra parte, de acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad fungitóxica de los extractos de brotes *in vitro* de quillay (resultados discutidos en 4.2.4), los cuales indicaron una mayor actividad antifúngica para extractos etanólicos, el contenido de saponinas y el efecto fungitóxico de los extractos se correlacionan positivamente, lo que permite inferir que la actividad antifúngica de los mismos en *B. cinerea*, respondería, al menos en parte, a la presencia de saponinas.

Diferentes estudios (Sfeir 1990; Parot, 1993; Copaja *et al.*, 2003) han demostrado que los contenidos de saponina en extractos acuosos de quillay (en condiciones naturales de crecimiento), se encuentran en el rango de 10-19% para la corteza, 10-11% para ramillas y 8,8-10,9% para la madera, los cuales, según los resultados obtenidos en este estudio, son superiores a los niveles detectados para extractos acuosos de brotes *in vitro* de quillay (~ 5%). Sin embargo, ambos resultados estrictamente no se podrían comparar en forma directa ya que las metodologías utilizadas, tanto en la extracción como el análisis, no fueron las mismas. Por ésto, con el propósito de demostrar que brotes *in vitro* sintetizarían una menor cantidad de saponinas en relación a plantas intactas, en este estudio se determinó además el contenido de saponinas de extractos acuosos de hojas de quillay *in vivo*. Los resultados indicaron que el contenido de saponinas en extractos acuosos de brotes *in vitro* es menor (3 veces) al de extractos acuosos de quillay *in vivo*. No obstante, según los resultados de los ensayos de actividad, ambos tipos de extractos exhibieron un efecto fungitóxico similar (no estadísticamente diferentes). Lo anterior, permite sugerir que brotes de quillay *in vitro* serían

capaces de sintetizar saponinas con un mayor nivel de actividad antifúngica que aquellas producidas en ejemplares en condiciones naturales de crecimiento, o bien, que la actividad de extractos de quillay *in vitro* se explicaría además por la presencia de otro tipo de moléculas. Por otra parte, los resultados indicaron que el contenido de saponinas detectado en extractos etanólicos de quillay *in vivo*, fue similar al de extractos etanólicos de brotes *in vitro* y, al igual que lo que ocurrió para extractos de quillay *in vitro*, superior al de extractos acuosos (datos no mostrados).

Además, en este estudio se determinó el contenido de saponinas en las fracciones más activas del extracto de acuerdo a los resultados de la evaluación de la acción fungitóxica *in vitro* de las mismas (F3, F4, F5 y F6), y en el extracto crudo, en la misma concentración. Los resultados indicaron que todas las fracciones evaluadas contienen saponinas, sin embargo las fracciones más polares (F5 y F6) fueron las que mostraron los mayores niveles (Figura 34), lo que respondería a la naturaleza altamente polar de estos compuestos (Uribe-Lamas, 1987; Martínez, 2001)



**Figura 34**. Equivalentes de saponina ( $\mu$ g mg de muestra<sup>-1</sup>) en el extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay y las fracciones activas del mismo. Las muestras fueron inyectadas en concentración final de 2,5 mg ml<sup>-1</sup>. Cada barra representa el promedio de 3 repeticiones  $\pm$  DE. Letras diferentes en las barras indican que los promedios son significativamente diferentes (Tukey, p  $\leq$  0,05).

Al relacionar los contenidos de saponinas con la actividad antifúngica de las fracciones (resultados discutidos en 4.8.2, Figura 30), se observa que F6, a pesar de ser la fracción que mostró el mayor nivel de acción fungitóxica, no fue la que presentó el mayor contenido de saponinas, y que F5, la cual exhibió la menor actividad antifungica entre las fracciones activas, fue la que presentó el mayor contenido de este metabolito, superando incluso al del extracto crudo. Estos resultados permiten inferir que F6 (y también F3 y F4), contendrían saponinas más activas que las presentes en F5, o bien, que la actividad de tales fracciones se debería probablemente a la presencia de otras moléculas bioactivas. Sin embargo, se ha documentado que mayores concentraciones de saponinas no siempre se traducen en una actividad antifúngica superior (Apablaza et al., 2002; Moya, 2003), lo cual se explicaría, según lo reportado por Osbourn (1996b), a que altas concentraciones de este metabolito facilitarían la formación de micelas (aglomeraciones), las cuales disminuyen la acción fungitóxica de los mismos. Ésto podría explicar en parte los resultados discutidos anteriormente (Figuras 33 y 34).

Con el propósito de complementar los resultados, se evalúo el efecto de una solución del producto utilizado como estándar (>70% de saponinas triterpénicas), en el crecimiento micelial in vitro de B. cinerea. Los resultados de este ensayo mostraron que Quillaja Ultra Powder, en una concentración de 250 µg ml<sup>-1</sup> redujo en un 28,8% el crecimiento micelial *in* vitro del patógeno con respecto al control, mientras el extracto etanólico de brotes in vitro de quillay, en la misma concentración y bajo la misma metodología, inhibió el crecimiento del hongo en un 64,5%. Este resultado apoya la hipótesis de que la actividad antifúngica de los extractos de quillay in vitro se debería, además del contenido de saponinas, a la presencia de otros constituyentes, lo que concuerda con lo reportado por Apablaza et al. (2002), quienes concluyen que el efecto fungitóxico de los extractos comerciales de quillay (QL Ultra, QL 1000 y QL 30B), en los hongos fitopatógenos E. cichoracearum y S. fuliginea, se debería a una acción conjunta entre las saponinas y el resto de los sólidos del producto, hecho que explicaría la mayor efectividad antifúngica de los extractos con menor grado de purificación. En este contexto, se ha reportado que los extractos de quillay, además de saponinas triterpénicas, contendrían proteínas, azúcares, algunas sales y una serie de compuestos fenólicos (Natural Response, 2004).

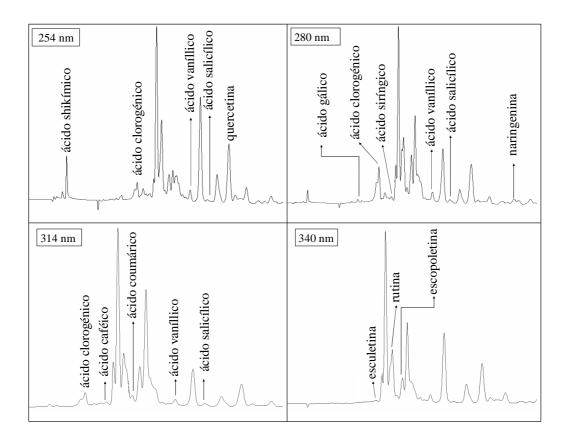
# 4.6.2 Contenido de compuestos fenólicos en el extracto etanólico

Considerando que la actividad antifúngica del extracto de brotes *in vitro* de quillay, de acuerdo a los resultados obtenidos, al parecer se explicaría no sólo por el contenido de saponinas, en este estudio se evaluó mediante análisis por HPLC la presencia de compuestos fenólicos (ver 3.8.2) en el extracto.

En la Tabla 7, se muestra la concentración de los compuestos fenólicos en el extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay, mientras en la Figura 35, los cromatogramas derivados de dicho análisis.

**Tabla 7.** Concentración de compuestos fenólicos, detectados por HPLC, en el extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay. El extracto fue evaluado en una concentración de 10% p/v. Los compuestos fueron detectados a 254, 280, 314 y 340 nm, de acuerdo al método empleado por Ruhland y Day (2000) modificado.

Compuesto	Tiempo de	Área	Concentración
	retención (min)	(mAu*s)	(mg ml <sup>-1</sup> )
Ácido shikímico	1,926	136,31	0,7985
Ácido clorogénico	4,745	363,21	0,2482
Esculetina	5,235	104,54	0,1350
Ácido caféico	5,240	175,75	0,2901
Rutina	5,713	915,83	0,0085
Ácido p-coumárico	5,845	261,87	0,0066
Escopoletina	6,022	354,49	0,3313
Ácido vaníllico	6,855	142,58	0,2523
Ácido salicílico	7,536	200,22	0,9352
Quercetina	8,403	479,01	0,0062
Naringenina	10,076	106,67	0,0036
Total			3,0155



**Figura 35.** Cromatogramas, obtenidos del análisis por HPLC para la detección de compuestos fenólicos, del extracto etanólico de brotes *in vitro* de quillay. El extracto fue inyectado en una concentración 10% p/v. La presencia de los compuestos se detectó a: 254, 280, 314 y 340 nm.

Los resultados confirmaron que el extracto etanólico de quillay *in vitro* contiene una serie de compuestos fenólicos, varios de los cuales han sido identificados en otras especies vegetales como metabolitos antifúngicos en hongos fitopatógenos. Tal es el caso de los ácidos clorogénico, caféico y p-coumárico (Derek *et al.*, 1989; Harborne y Baxter, 1993), las cumarinas esculetina y escopoletina (Uritani *et al.*, 1953; Minamikawa *et al.*, 1962; Minamikawa *et al.*, 1964 Murray *et al.*, 1982; Tanaka *et al.*, 1983; Harborne y Baxter, 1993; Gutiérrez *et al.*, 1995; Prats *et al.*, 2006), y los flavonoides rutina (Beschia *et al.*, 1984; Padmavati *et al.*, 1997; Báidez *et al.*, 2006), naringenina (Mizobuchi y Sato, 1984; Kokubun y Harborne, 1995; Padmavati *et al.*, 1997; Danelutte *et al.*, 2003) y quercetina (Hirasawa y Takada, 2004; Báidez *et al.*, 2006). En base a éstos resultados, es posible concluir que la actividad antifúngica del extracto etanólico de quillay cultivado *in vitro* en *B. cinerea*, se debería al menos en parte a la presencia de saponinas y algunos compuestos fenólicos.

### **5 CONCLUSIONES**

- En este estudio se logró implementar un sistema eficiente de propagación *in vitro* de quillay a partir de yemas axilares, lo que representa un aporte al desarrollo de técnicas biotecnológicas para el estudio y utilización comercial de esta especie, sin arriesgar su preservación como recurso nativo.
- Los extractos de brotes *in vitro* de quillay reducen significativamente la germinación de conidias y crecimiento micelial *in vitro* de *Botrytis cinerea*, siendo más activos extractos etanólicos que acuosos; lo que se traduce en una disminución de los niveles de infección por el patógeno a nivel foliar y de frutos en condiciones *in vivo*.
- La actividad antifúngica de extractos de brotes *in vitro* de quillay, fue comparable a la de fungicidas comerciales, aunque levemente inferior a la de extractos de hojas de quillay en condiciones naturales de crecimiento. Sin embargo, el cultivo de tejido *in vitro* de plantas constituye una alternativa interesante para la utilización de esta especie en la formulación de fungicidas naturales, ya que ofrece sistemas de producción constantes, y consistencia en los rendimientos y la calidad de los productos obtenidos, sin afectar en forma negativa el estado de conservación de la misma.
- De los ensayos orientados a dilucidar el mecanismo de acción que explicaría la acción fungitóxica del extracto en estudio en *B. cinerea*, se desprende que éste fue capaz de: alterar en forma moderada el proceso de respiración celular y la permeabilidad de la membrana plasmática del hongo; disminuir la actividad de enzimas antioxidantes (CAT y SOD) e incrementar moderadamente los niveles de peróxido de hidrógeno y lipoperoxidación en cultivos de *B. cinerea*; y reducir significativamente la producción de cutinasa y poligalacturonasa, e inhibir en forma importante y dosis dependiente la actividad lacasa *in vitro* del patógeno.

- Resultados del fraccionamiento del extracto en estudio, indicaron que las fracciones más polares, además de ser las mayoritarias, fueron las más activas, sin embargo la acción fungitóxica de ninguna de ellas superó a la del extracto total, lo que podría responder a la presencia de un efecto sinérgico entre los componentes de las diferentes fracciones. Estos resultados plantean el uso del extracto crudo de brotes *in vitro* de quillay como potencial fungicida para el control de botritis, lo que reduciría tanto el costo de obtención del producto, como el riesgo de desarrollo de resistencia en el patógeno.
- Los brotes de quillay obtenidos mediante cultivo *in vitro* sintetizan saponinas, y compuestos fenólicos, tales como escopoletina, esculetina, los ácidos *p*-coumárico, caféico y clorogénico, rutina, naringenina y quercetina, los cuales han sido identificados en especies vegetales como metabolitos antifúngicos para hongos fitopatógenos.
- El cultivo *in vitro* de quillay representa una alternativa interesante para la obtención de extractos con propiedades antifúngicas en *B. cinerea*, la cual se explicaría, al menos en parte, por la presencia de saponinas y compuestos fenólicos.

### 6 PROYECCIONES DEL ESTUDIO

Las proyecciones que surgen de este trabajo son varias y en diferentes ámbitos:

- El sistema de producción in vitro de quillay podría ser utilizado en programas de reforestación, a partir de la selección de plantas elite, lo que permitiría recuperar áreas sobreexplotadas.
- El sistema de propagación *in vitro* de quillay permitirá realizar estudios tanto fisiológicos y moleculares, orientados a identificar mecanismos de tolerancia a condiciones extremas. A partir de tales estudios, se podrán realizar además análisis geonómicos, proteómicos y metabolómicos en una especie de gran relevancia comercial. Por ejemplo, el poder identificar genes involucrados en la síntesis de saponinas, o desarrollar un sistema de elicitación que incremente la síntesis de estos metabolitos en condiciones controladas, ayudaría tanto en el campo básico como aplicado, considerando la gran demanda de tales compuestos.
- El sistema de propagación *in vitro* de quillay, permitirá obtener un extracto inhibidor del hongo fitopatógeno *B. cinerea*. Este extracto al ser natural tendrá aplicación tanto en sistemas de producción agrícola tradicionales como en la agricultura alternativa.
- La efectividad del extracto de quillay *in vitro* debería ser evaluada en otras enfermedades vegetales de difícil control, tales como oídios y fusariosis.
- El uso de extractos de quillay *in vitro* a nivel comercial requerirá de una evaluación ambiental y económica que justifique su uso a nivel de campo. En este contexto, aún falta por desarrollar investigaciones referidas, entre otros, al uso conjunto del extracto con fungicidas comerciales, la evaluación de posibles respuestas de resistencia sistémica adquirida, y su posible efecto tanto en el rendimiento y calidad de los cultivos, como en el desarrollo de microorganismos benéficos.

### 7 REFERENCIAS

- **Abu-Goukh, A.A., Strand, L.I., Labavitch, J.M. 1983.** Development-related changes in decay susceptibility and polygalacturonase inhibitor content of Bartlett pear fruit. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 101-109.
- **Abu-Goukh, A.A. and Labavitch, J.M. 1983.** The *in vivo* role of Bartlett pear fruit polygalacturonase inhibitors. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 123-135.
- **Achenbach, H. Stocker, M. and Constenla, M.A. 1988.** Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca. Phytochemistry* 27:1835-1841.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L. A. and Bessis. R. 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mould. *J. Chem. Ecol.* 23:1689-1702.
- Adrian, M., Rajei, H., Jeandet, P., Veneau, J. and Bessis, R. 1998. Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia. *Phytopathology* 88: 472-476.
- **Afek, U., Sztejnberg, A. and Carmely, S. 1986**. 6,7-Dimethoxycoumarin, a citrus phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora gummosis*. *Phytochemistry* 25: 1855-1856.
- **Afek, U., Orestein, J., Carmeli, S., Rodov, V. and Bar Joseph, M. 1999.** Umbelliferone, a phytoalexin associated with resistance of immature of Marsh grape fruit to *Penicillium digitatum. Phytochemistry* 50(7): 1129 -1132.
- Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology (4<sup>a</sup> ed.). Academic Press, 635 pp.

- **Aleu, J. and Collado, I. G. 2001.** Biotransformation by Botrytis species. *J. Mol. Catal, B Enzym.* 13: 77-93.
- **Aleu, J., Hanson, J., Hernández, R. and Collado, I. 1999.** Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoids patchoulol by *Botrytis cinerea. J. Nat. Prod.* 62: 437-440.
- **Aleu, J., Hanson, J., Hernández, R., Collado, I.G. 2001.** Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoids patchoulol, ginsenol, cedrol and globulol by *Botrytis cinerea*. *J. Mol. Catal.*, *B Enzym.* 11: 329-334.
- **Alfermann, A.W. and Petersen, M. 1995**. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 43: 199-205.
- **Álvarez, M. 1982.** *Botrytis cinerea*: un antiguo problema de la vid. *Investigación y Progreso Agropecuario, La Platina* 12:17-19.
- Amano, Y., Kubota, M. and Kagami, M. 1979. Oxygen uptake of Koshu grape must and its control. *Hokkokogaku Kaishi* 57: 92-101.
- **Antonov, A., Stewart, A. and Walter, M. 1997**. Inhibition of conidium germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by natural products. *Proc. 50th. N.Z. Plant Protection Conf.* 159-164.
- Apablaza, G., Díaz, M., San Martín, R y Moya, E. 2002. Control de oídio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de quillay (*Quillaja saponaria*). *Cien. Inv.. Agr.* 29: 83-90.
- **Arimoto Y, Homma Y, Ohsawa T. 1986**. Studies on citrus melanose and citrus stemend rot by *Diaporthe citri* (Faw.) Wolf. Part 5. Identification of phytoalexin in melanose spot. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 52: 620-625.

- **Armah, C.N., Mackie, A.R., Roy, C., Price, K., Osbourn, A.E., Bowyer, P. and Ladha, S. 1999.** The membrane permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. *Biophys. J.* 76: 281–290.
- **Arnason, J.T., Philogene, B.J.R. and Morand, P. 1989**. Insecticides of plant origin. *Amer. Chem. Soc.* Washington DC, 224 p.
- Arras, G., Agabbio, M., Piga, A., D'hallewin, G., Gerasopoulos, D., Olympios, C. and Passam, H., 1995. Fungicide effect of volatile compounds of *Thymus capitatus* essential oil. *Acta Horticulturae* 379:593-600.
- **Atkinson, P. and Blakeman, J.P. 1982.** Seasonal occurrence of an antimicrobial flavanone sakuranetin, associated with glands on leaves of *Ribes nigrum. New Phytologist*. 92(1): 63-74.
- **Ayar-Kayali, H. and Tarhan, L. 2004.** The effect of cultural conditions on the variations of SOD, CAT and GSH-Px activities and LPO levels in the filamentous fungus *Fusarium equiseti. Turk J. Chem.* 28: 213-222.
- Badei, A.T.M., El-Akel, H.H., Morsi, P., Baruah, R.K., Sharma, R.S., Singh and A. Ghosh. 1996. Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliforme*. *J. Essent. Oil Res.* 8: 411-412.
- **Báidez, A.G., Gómez, P., Del Rio, J.A. and Ortuño, A. 2006.** Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 69: 224-229.
- Bailey, J. A., O'Connell, R. J., Pring, R. J., and Nash, C. 1992. Infection strategies of Colletotrichum species. En: Bailey, M.J. and Jeger, J.A. (eds.). Colletotrichum: Biology, Pathology and Control. CAB Int., Wallingford, UK. p 88-120.

- Bais, H., Walker, T., Stermitz, R., Hufbaur, A. and Vivanco, J. 2002. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum. Plant Physiol. Biochem.* 40: 983-995.
- **Bajpai, V.K., Rahman, A. and Kang, S.C. 2007.** Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Ind. Crops Prods.* 26(1): 28-35.
- **Bajwa, R., Khalid, A. and Cheema, T.S. 2003.** Antifungal activity of allelopathic plant extracts, III. Growth response of some pathogenic fungi to aqueous extract of *Parthenium hysterophorus. Pakistan J. Plant Pathol.* 2: 145–156.
- **Baker, E. A., and I. M. Smith**. **1977.** Antifungal compounds in winter wheat resistant and susceptible to *Septoria nodorum*. *Ann. Appl. Biol.* 87: 67–73.
- **Baker, C. and Bateman, D. 1978.** Cutin degradation by plant pathogenic fungi. *Phytopathol.* 68: 1577-1584.
- Ball, A.M., Sawczyc, M.K., Ashby, A.M., Ingram, D.S. and Johnstone, K. 1991.
  Transformation of the fungus *Pyrenopeziza brassicae*, cause of light leaf spot of brassicas, and complementation of mutants using a genomic library. *Exp. Mycol.* 15: 243-254.
- **Bangham, A.D. and Horne, R.W. 1962.** Action of saponin on biological cell membranes. *Nature* 196: 952–953.
- **Bar-Nun, N. and Mayer, AM. 1989.** Cucurbitacins-repressors of induction of laccase formation. *Phytochemistry* 28 (5): 1369-1371.
- **Bar-Nun, N. and Mayer, A.M. 1990.** Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 29: 787-791.

- **Bar-Nun, N., Tal Lev, A., Harel, E. and Mayer, A.M. 1988.** Repression of laccase formation in *Botrytis cinerea* and its possible relation to phytopathogenicity. *Phytochemistry* 27(8): 2505-2509.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E. and Wilson, C.L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Prot.* 22: 1087–1092.
- Beech, F.W., Burroughs, L.F., Timberlake, C.F. and Whiting, G.C. 1979. Progrès récent sur l'aspect chimique et l'action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux (SO<sub>2</sub>). *Bulletin de L'O.I.V.* 586: 1001-1022.
- **Bell, A.A., Stipanovic, R.D., Howell, C.R. and Fryxell, P.A. 1975.** Antimicrobial terpenoids of Gossypium: Hemigossypol, 6-methoxyhemigossypol and 6-deoxyhemigossypol. *Phytochemistry* 14(1): 225-231.
- Ben-Hod, G., Nun, N.B., Tzaban, S., and Mayer, A.M. 1997. Inhibitors of polygalacturonase in calli of *Orobanche aegyptiaca*. *Phytochemistry* 45: 1115-1121.
- **Benedetti, S., Delard, C. and Roarch, F. 2000.** Quillay: Una alternativa multipropósito para la zona central. Documento Divulgativo 20. Proyecto PRODECOP SECANO-INFORFIA. Santiago. Chile. 12p.
- Benito, E., Arranz, M. y Eslava, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: s43-s46.
- **Bennett, R. and Wallsgrove, K. 1994.** Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 127: 617-633.
- **Berrie, A. 1994.** The importance of *Botrytis cinerea* as a storage rot of apple cv. Cox and pear cv. *Conference. Norweg. J. Agric. Sci.* S17: 383-389.

- **Beschia, M., Leonte, A. and Oancea, I. 1984.** Phenolic compounds with biological activity. *Bull. Univ. Galati Faso* 6: 23-27.
- **Beth-Din, D., Berson, M. and Sztejnberg, A. 1996.** AQ 10, a biofungicida for the control powdery mildew of grapes. *Phytoparasitica* 24(2): 156-157.
- Bettiol, W., and Stadnik, M. 2001. Controle alternativo de oídios. En: Stadnik, M. y Rivera, M. (edts.). Oídios. p. 165-192. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP; Brasil. 484p.
- **Bhaskara, M., Angers, P., Gosselin, A. and Arul, J. 1998.** Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizophus stolonifer* on strawberry fruits. *Phytochemistry* 47: 1515-1520.
- **Bhojawani, S.S. 1990.** Plant tissue culture: aplications and Limitations. Development in crop science 19. Elsevier, N.Y. 461 p.
- **Bhojawani, S.S and Razdab, M.K. 1996.** Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition. Elsevier, Amsterdam, N.Y. 767 p.
- **Billal, F. and Thurston, C.F. 1996**. Purification of laccase II from *Armillaria mellea* and comparison of its properties with those of laccase I. *Mycol. Res.* 100: 1099–1105.
- **Biodiversity References**. Biological Science-University of Paisley. http://www-biol.paisley.ac.uk/bioref/index2.html; Fotografías © A.J. Silverside.
- **Bishop, C.D. and Thornton, I.B. 1977.** Evaluation of the antifungal activity of the essential oils of *Monarda citriodora* var. citriodora and *Melaleuca alternifolia* on post harvest pathogen. *J. Essent. Oil Res.* 9: 77–82.

- **Bocquet, F., Moncomble, D. and Valade, M. 1995.** Etat sanitaire de la vendange et qualitèdes vins. *Le Vigneron Champenois* 7/8: 15–23.
- **Bocquet, F., Moncomble, D. and Valade, M. 1996.** Raisins botrytisès: Adapter le fractionnement des jus lors du pressurage. *Le Vigneron Champenois* 9: 15–24.
- **Bonnen, A.M., and Hammerschrnidt, R. 1989.** Role of cutinolytic enzymes in infection of cucumber by *Collectotrichum lagenanum. Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35: 475-481.
- **Bostock, R.M., Wilcox, M., Wang, G. and Adaskaveg, J.E. 1999.** Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54 (1-2): 37-50.
- Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D. and Osbourn A. 2002. Fungal pathogenesis: A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* 418 (6900): 889-92.
- **Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi, L. and Hmamouchi, M. 2003.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *J. Ethnopharmacol.* 89: 165–169.
- **Boyraz, N. and Özcan, M. 2006.** Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *Int. J. Food Microbiol*.107(3): 238-242.
- **Bradford, M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- **Brambl, R. 1975.** Characteristics of developing mitochondrial genetic and respiratory functions in germinating fungal sopores. *Biochem. Biophys. Acta.* 396: 175-186.

- **Brambl, R. 1977.** Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination, Development of cytocrome c oxidase activity. *Arch. Biochim. Biophys.* 182: 273-281.
- **Brambl, R. 1980.** Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: biosynthesis and assembly of cytocrome c oxidase in *Botrydiplodia theobromae*. *J. Biol. Chem.* 255: 7673-7680.
- **Brambl, R. and Josephson, M. 1977**. Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: respiratory cytochromes of dormat and germinating spores of Botrydiplodia. *J. Bacteriol.* 129: 291-297.
- **Brent, K.J. and Hollomon, D.W. 1998.** Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC Monograph No. 2 GCPF (now Crop. Life International, Brussels) 48pp.
- **Brinker, A.M. and Seigler, D.S. 1991.** Isolation and identification of piceatannol as a phytoalexin from sugarcane. *Pytochemistry* 30(10): 3229-3232.
- **Burden, R.S. and Kemp, M.S. 1983.** (-)-7-Hydroxycalamenene, a phytoalexin from *Tilia europea. Phytochemistry* 22: 1039-1040.
- Buzi, A., Chilosi1, G., Timperio, A., Zolla, L., Rossall, S. and Magro1, P. 2003. Poplygalacturonase produced by *Botrytis fabae* as elicitor of two furanoacetylenic phytoalexins in *Vicia faba* pods. *J. Plant Pathol.* 85(2): 111-116.
- Cainelli, G., Petricevich, V., Rau, I. and Da Silva, W. 1995. Effect of saponins *Quillaja* saponaria Molina on antibody, tumor necrosis factor and interferon-gamma production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 22: 31-37.
- Calva-Calva, G., Esparza García, F, Pérez Vargas, J., Martínez Juárez, V., Silva Cervantes, S. y López Sánchez, C. 2002. Plantas como biorreactores para la producción de biomoléculas y remoción de xenobióticos. *Avance y Perspectiva* 21: 307-312.

- Canton, M., Gennari, F., Luvisetto, S. and Azzone, G.F. 1996. The nature of uncoupling by n-hexane, 1-hexanethiol and 1-hexanol in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys.*Acta 1274: 39-47
- Carta, C., Moretti, M.D.L. and Peana, A.T., 1996. Activity of the oil of *Silva officinalis* L. against *Botrytis cinerea*. *J. Essential Oil Res.* 8(4): 399-404.
- Celimene, C., Micales, J., Ferge, L. and Young, R. 1999. Efficacy of pinosilvyns against white-root and brown-root fungi. *Holzforschung* 53: 491-497.
- **Celimene, C., Smith, D., Young, R. and Stanosz, G. 2001.** *In Vitro* inhibition of *Sphaeropsis sapinea* by natural stilbenes. *Phytochemistry* 56: 161-165.
- Chacón, A.G., Saborío, F., Gómez, L., Torres, S. y Valverde, R. 2000. El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatación de yampi (*Discorea trifida*) y ñame (*Discorea alata*). Agronomía Costarricense 24 (2): 57-64.
- Chapagain, B., Wiesman, Z., and Tsror (Lahkim), L. 2007. *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Ind. Crops Prod.* (*In Press*).
- Chauhan, N., Latge, J.P. and Calderone, R. 2006. Signalling and oxidant adaptation in Candida albicans and Aspergillus fumigatus. Nat. Rev. Microbiol. 4(6): 435-444.
- **Chavali, R. and Campbell, J. 1987a.** Inmunomodulatory effects of orally-administered saponins and nonspecific resistance againts rabies infection. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 84: 129-134.
- **Chavali, R. and Campbell, J. 1987b.** Adjuvant effects of orally administered saponins on humoral and cellular immune response in mice. *Immunobiology* 174: 347-359.

- Chaves, N. and Wang, A. 2004. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomía Costarricense* 28(2): 73-85.
- **Cheeke, P. 1989.** Physiological and pharmacological properties of saponins. En: Toxicants of Plant Origin Vol. II. Glycosidic, CRC Press, Inc. p. 118-132.
- Chefetz, B., Chen, Y. and Hadar, Y. 1998. Purification and characterization of laccase from Chaetomium thermophilium and its role in humification. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3175-3179.
- **Chew, F. 1988**. Biological effects of glucosinolates. En: Cutler, H (ed.). Biologically active natural products: potential use in agriculture. p.155-181.
- Chitarra, G., Abee, T., Rombouts, F. and Dijksterhuis, J. 2005. 1-Octen-3-ol inhibits conidia germination of *Penicillium paneum* despite of mild effects on membrane permeability, respiration, intracellular pH, and changes the protein composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54(1): 67–75.
- Choi, G., Jae- Lee, H., Yun-Cho., K. 1996. Lipid peroxidation and membrane disruption by vinclozolin in dicarboximide-susceptible and -resistat isolates of *Botrytis cinerea*. *Pest. Biochem. Physiol.* 55: 29-39.
- Choi, G., Jae-Lee, H., Yun-Cho, K. 1997. Involvement of catalase and superoxide dismutase in resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicide vinclozolin. *Pest. Biochem. Physiol.* 59: 1-10.
- Chun, H.K., Ko, H.R., Moon, H.S., Kho, Y.H. 1995. Preventive effect of ebelactone B, an esterase inhibitor on rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *J. Microbiol*. *Biotechn*. 5: 335-340.

- Cole, M.D., Bridge, P.D., Dellar, J.E., Fellows, L.E., Cornish, M.C. and Anderson, J.C. 1991. Antifungal activity of Neo-clerodane diterpenoids from Scutellaria. *Phytochemistry* 30(4): 1125-1127.
- Cole, M., Wiechel, T., Warren, M. and Holmes, R. 2004. Ensuring optimal quality through management strategies for *Botrytis cinerea*. Department of Primary Industries. Monash University. Australian Government. 66 p.
- Collado I. G., Hernández-Galán R., Duran-Patrón R., and Cantoral J. M. 1995. Metabolites from a shake culture of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 38: 647-650.
- **Comménil, P., Belingheri, L. and Dehorter, B. 1998.** Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52: 1-14.
- Commun, C., Mauro., M., Chupeau, Y., Boulay, M., Burrus, M. and Jeandet, P. 2003. Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 317–323.
- **CONAF. 1989.** Libro rojo de la flora terrestre de Chile (primera parte). Ministerio de Agricultura. Santiago. Chile. 157p.
- Conn, K.L. Tewari, J.P. and Dahiya, J.S. 1988. Resistance to *Alternaria brassicae* and phytoalexin elicitation in rapeseed and other crucifers. *Plant Sci.* 56: 21–25.
- Copaja, S.V., Blackburn, C., Carmona, R. 2003. Variation of saponin contents in *Quillaja* saponica Molina. Wood Sci. Technol. 37: 103-108.
- Corkovic-Périca, M. 2003. *In vitro* propagation of *Centaurea rupestris* L. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 45: 127-130.

- Cordero, A. and Cotoras, M. 1997. Producción de cutinasas por *Botrytis cinerea*.

  Contribuciones Científicas Tecnológicas. 115: 1-11.
- Cotoras, M., García, C., Lagos, C., Folch, C. and Mendoza, L. 2001. Antifungal activity on *Botrytis cinerea* of flavonoids and diterpenes isolated from the surface of *Pseudognaphalium* spp. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 46(4): 433- 440.
- **Cotoras, M., Folch, C. and Mendoza, L. 2004.** Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoides kaurenoic acid and 3β-hidroxy-kaurenoic acid. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2821-2826.
- Couture, R.M., Routley, D.G. and Dunn, G.M. 1971. Role of cyclic hydroxamic acids in monogenic resistance of maize to *Helminthosporium turcicum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1: 515–521.
- Crisosto, C. and Mitchell, F.G. 2002. Postharvest handling systems: Kiwifruit, pp. 371-374. En: Kader, A. (ed). Postharvest technology of horticultural crops. Ediciones University of California. California, Estados Unidos. 535 p.
- **Cronquist, A. 1977.** On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms. *Plant. Syst. Evol. supll* 1: 179-189.
- Croteau, R., Kutchan, T. and Lewis, N. 2000. Natural products (Secondary Metabolites). pp. 1250–1318. En: Buchanan, B., Gruissem, B. and Jones, R. (eds). Biochemistry and molecular biology in plants. (Chapter 24). American Society of Plant Biologists, Rockville.
- Cruz, G. 2000. Silvicultura del quillay. En: Seminario-Taller "El quillay una nueva alternativa económica: Antecedentes para su comercialización, cultivo y manejo forestal. Manejo forestal y uso industrial del quillay". Proyecto FONDEF D971-2010. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile. 18p.

- Cruz, G., Arellano, E. y Pulido, A. 2000. Innovaciones en el manejo y uso industrial del quillay. *Agronomía y Forestal U.C.* 6: 21-25.
- Cruz, G. y Palma, C. 1999. Distribución nacional del quillay. Proyecto FONDEF D97-I2010 Manejo forestal y uso industrial del quillay. Departamento de Ciencias Forestales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile. 10p.
- **Daayf, F., Schmitt, A. and Belanger, R. 1997.** Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiol*. 113(3): 719–727.
- **Dafereraa, D., Ziogas, B. and Polissiou, M. 2003.** The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. michiganensis. *Crop Prot.* 22(1): 39-44.
- **Dakora, F. and Phillips, D. 1996.** Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49(1): 1-20.
- **Danelutte, A.P., Lago, J.H., Young, M.C. and Kato, M.J. 2003.** Antifungal flavonones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kinth. *Phytochemistry* 64: 555-559.
- **Davies, K.A. 1997.** Early events in pathogenesis of *Pyreno peziza* brassicae on *Brassica napus*. PhD Thesis, University of Cambridge, U.K.
- Davies, A., De Lorono, I., Foster, S., Li, D., Jonhstone, K. and Ashby, A. 2000. Evidence for a role of cutinase in pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on brassicas. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57: 63-75.

- **Davis, R.H. 1991.** Glucosinolates. En: DMello, J.P., Duffus, C.M. and Duffus, J.H. (eds.) Toxic substances in crop plants. (Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry), pp. 202-225.
- **Debieu, D., Bach, J., Hugon, M., Malosse, C. and Leroux, P. 2001.** The hydroxyanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Manag. Sci.* 57 (11): 1060-1067.
- De Lange, J.H., Vincent, A.P, Du Plessis, L.M., Van Wyk, P.J. and Ackerman, L.G. 1976.

  Scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) induced in citrus peel by black spot,

  Guignardia citricarpa Kiely. Phytophylactica 8: 83-84.
- **De Lorenzo, G., D'Ovidio, R. and Cervone, R. 2001.** The role of polygacturonase inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu. Review Phytopathol.* 39: 313-335.
- **De Lorenzo, G. and Ferrari, S. 2002.** Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 295-299.
- **Dercks, W. and Creasy, L.L. 1989.** The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 189-202.
- **Derek, V., Banthorpe, H., Bilyard, J. and Brown, G.D. 1989**. Enol esters of caffeic acid in several genera of the Labiatae. *Phytochemistry* 28(8): 2109-2113.
- **Dewick, P.M. 2002.** Medicinal Natural Products. Copyright-John Wiley & Sons, Ltd. ISBNs, 0471496405 (Hardback); 0471496413 (paperback); 0470846275 (Electronic).
- **Dickman, M.B. and Alvarez, A.M. 1983.** Latent infection of papaya cause by Colletotrichum gloesporioides. *Plant Disease* 67: 748-750.

- **Dickman, M.B., Patil, S.S. and Kolattukudy, P.E. 1982**. Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 333-347.
- **DiCosmo, F. and Misawa, M. 1985.** Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. *Trends Biotechnol.* 3(12): 318-322.
- Dixon, R.A. 1991. Plant Cell Culture. A Practical Approach. IRL, Press, Washington. 236 p.
- **Dixon, R. 2001.** Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- **Domingo, D. and López-Brea, M. 2003.** Plantas con acción antimicrobiana. *Rev. Esp. Quimioterap.* 16: 385-393.
- **Donèche, B. 1993.** Botrytized wines. En: Fleet, G.H. (ed.). Wine microbiology and biotechnology. pp. 327–351. Switzerland: Harwood Academic Publishers.
- **Donoso, C. y Cabello, A. 1978.** Antecedentes fenológicos y de germinación de especies leñosas chilenas. *Ciencias Forestales* 1(2): 31-41.
- **Dörnenburg, H. and Knorr, D. 1995.** Strategies secondary for the improvement of metabolite production in plant cell cultures. *Enz. Microb. Technol.* 17: 674-684.
- **Dourmashkin, R.R., Dougherty, R.M. and Harris, R.J. 1962.** Electron microscopic observations on *Rous sarcoma* virus and cell membranes. *Nature* 194: 1116-1119.
- **D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S. and Bellincampi, D. 2004.** Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1696: 237–244.

- D'Ovidio, R., Raiola, A., Capodicasa, C., Devoto, A., Pontiggia, D., Roberti, S., Galletti, R., Conti, E., O'Sullivan, D. and De Lorenzo, G. 2004. Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiol*. 135: 2424-2435.
- **Dow, J.M. and Callow, J.A. 1978.** A possible role for α-tomatine in the varietal-specific resistance of tomato to *Cladosporium fulvum. Phytopathol.* 2 (92): 211-216.
- **Dubernet, M. and Ribéreau-Gayon, P. 1973.** Presence et significance dans les moûts et les vins de la tyrosinase du raisin. *Conn. Vigne Vin.* 7: 283-292.
- Dubernet, M., Ribéreau-Gayon, P., Lerner, H.R., Harel, E. and Mayer, A.M. 1977.

  Purification and properties of laccase from *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 16: 191–193.
- **Dubourdieu, D., Pucheu-Plante, B., Mercier, M. and Ribereau-Gayon, P. 1978.** Structure, role et localisation d'un glucane secrete par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. *Comptes Rendus Academie des Sciences* (Paris). 287D: 571-73.D.
- **Duery, L. 2003.** El quillay no sólo sirve para matar polillas. El Mercurio. *Ciencia y Tecnología* [lunes 14 de abril del 2003]. Santiago. Chile. A11.
- **Duke, S.O. 1990**. Natural pesticides from plants. En: Janick, J. and Simon, J.E. (eds.). Advances in new crops. p. 511-517. Timber Press, Portland, OR.
- **Duncan, A.J. 1991.** Glucosinolates. En: DMello, J.P., Duffus, C.M. and Duffus, J.H (eds). Toxic substances in crop plants. pp. 126-147. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.

- **Edlich, W., Lorenz, G., Lyr, H. and Pommer, E. 1988.** Studies on the biochemical basis of resistance against dicarboximide fungicides *Proc. Br. Crop Prot. Conf. Pest Disease*. 1: 391-396.
- Edlich, W., Lorenz, G., Lyr, H., Nega, E and Pommer, E. 1989. New aspects on the infection mechanism of *Botrytis cinerea* Pers. *Neth. J. Plant Pathol.* 95 (Suppl. 1): 53-62.
- **Edlich, W. and Lyr, H. 1992.** Target sites of fungicides with target site activity, have not been conducted primary effects on lipid peroxidation. En: Köller, W (ed). Target sites of fungicide action. pp. 53-68. CRC Press, Boca Raton, FL.
- **Edlich, W. and Lyr, H. 1995.** Mechanism of action of dicarboximide fungicides. En: Lyr, H (ed.). Modern selective fungicides: properties, applications, and mechanisms of action. pp. 119-131. Gustav Fisher Verlag, Jena.
- **Edwards, R. and Gatehouse, J.A. 1999**. Secondary metabolism. En: Lea, P.J. and Leegood, R.C. (eds.). Plant biochemistry and molecular biology (2nd edn). John Wiley & Sons Ltd.
- **Elad, Y. 1988**. Involvement of ethylene in the pathogenicity of *Botrytis cinerea* Pers. on rose and carnation flowers and the possibility of control. *Ann. Appl. Biol.* 113: 589-598.
- **Elad, Y. 1995.** Mycoparasitism. En: Kohmoto, K., Singh, U.S. and Singh, R.P. (eds.) Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular basis. Volume II: Eukaryotes. pp. 289-307.Pergamon, Elsevier Science Ltd. Oxford, UK.,
- **Elad, Y. 1997.** Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biol. Rev. Cambridge Philosophical So.* 72: 381-422.

- **Elad, Y., Köhl, J. and Fokkema, N. 1994.** Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European J. Plant Path.* 100: 315-336.
- Elad, Y. and Zimand, G. 1991. Experience in integrated chemical-biological control of grey mould (Botrytis cinerea). Contribution from the Agricultural Research Organization.

  Agriculture Volcanic Center. Bet Dagan, Israel . 3274: 195-199.
- Elmer, P.A. and Reglinski, T. 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathol.* 55: 155–177.
- **Elvir, M. 1993.** Efecto del etanol sobre las membranas biológicas. *Rev. Med. Hondur.* 61: 20-24.
- Enjalbert, B., MacCallum, D., Odds, F. and Brown, A. 2007. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect*. *Immun*. 75(5): 2143-51.
- **Esterio, M. and Auger, J. 1997.** Control de *Botrytis cinerea* Pers. en vid (*Vitis vinifera* L.) utilizando fungicidas no convencionales: BC-1000 y Trichodex. *Aconex* 54: 11-17.
- Fan, X., Mattheis, J.P. and Roberts, R.G. 2000. Biosynthesis of phytoalexin in carrot root requires ethylene action. *Physiologia Plantarum* 110 (4): 450-454.
- **Faretra, F., Antonacci, E. and Pollastro, S. 1988.** Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *J. General Microbiol*. 134: 2543-2550.
- **Farooq, A. and Tahara, S. 1999.** Fungal metabolism of flavonoids and related pohytoalexins. *Curr. Top. Phytochem.* 2: 1-33.

- **Farooq, A. and Tahara, S. 2000.** Biotransformation of two terpenes, α-santonin and sclareol by *Botrytis cinerea*. *Z. Naturforsch.* 55: 713-717.
- Farooq, A., Choudhary, M., Arman, A., Tahara, S., Can Baser, K. and Demirci, F. 2002. Detoxification of terpinolene by plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Z. Naturforsch.* 57c: 863-866.
- **Fenwick, G.R., Heaney, R.K., and Mullin, W.J. 1983.** Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18: 123-301.
- Fiori, A., Schwan, K., Stangarlin, J., Vida, J., Scapim, C., Cruz., M. and Pascholati, S. 2000. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *J. Phytopathology* 148: 483-487.
- Flancy, C. 1998. Œnologie; Fondements scientifiques et technologiques. Ed. Lavoisier, París.
- **Forster, B. and Staub, T. 1996.** Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Prot.* 15(6): 529-537.
- **Fowler, N. 1986.** The role of competition in plant communities in arid and semiarid regions. *Ann. Rev. Ecol. System.* 17: 89-110.
- **Francis, S.A., Dewey, F.M. and Gurr, S.J. 1996.** The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* f.sp. hordei. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49: 201-211.
- **Franich, R.A., Gadgil, P.D. and Shain, L. 1983.** Fungistatic effects of *Pinus radiata* needle epicuticular fatty and resin acids on *Dothistroma pini. Physiol. Plant Pathol.* 23: 183-195.

- **Fravel, D. 1999.** Hurdles and bottlenecks on the road to biocontrol of plant pathogens. *Aust. Plant Pathol.* 28: 53-56.
- **Fridovich, I. 1978.** The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- Friebe, A. 2001. Role of benzoxazinones in cereals. J. Crop Prod. 4: 379-400.
- Friebe, A., Vilich, V., Hennig, L., Kluge, M. and Sicker, D. 1998. Detoxification of benzoxazolinone allelochemicals from wheat by *Gaeumannomyces graminis* var. tritici, *G. graminis* var. graminis, *G. graminis* var. avenae, and *Fusarium culmorum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2386-2391.
- **Friedman, M. 2007.** Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol. Nutr. Food Res.* 51(1): 116-134.
- **Friend, 1977.** En: Swain, T., Harborne, B. and van Sumere, C.F. (ed.). Recent advances in phytochemistry and biochemistry of plant phenolics. Plenum. Press. New York, 557 p.
- **Fritz, R., Lanen, C., Colas, V. and Leroux, P., 1997.** Inhibition of methionine biosynthesis in *Botrytis cinerea* by the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pestic. Sci.* 49: 40-46.
- **Fry, W.E., and Evans, P.H. 1977.** Association of formamide hydrolase with fungal pathogenicity to cyanogenic plants. *Phytopathology* 67: 1001-1006.
- **Fry, W.E. and Myers, D.F. 1981.** Hydrogen cyanide metabolism by fungal pathogens of cyanogenic plants. En: Vennesland, B., Knowles, CJ., Conn, E.E., Westley, J. and Wissing, F. (eds). Cyanide in biology. pp. 321-334. London: Academic Press.

- **Gamborg, L.O. 2002.** Plant tissue culture biotechnology Milestones. *In vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* 38: 84–92.
- **Gamborg, L.O. and Phillips, C.G. 1995.** Plant cell and organ culture: fundamental methods. Springer- Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. 349 p.
- **Gao, S. and Shain, L. 1995.** Activity of polygalacturonase produced by *Cryphonectria* parasitica in chestnut bark and its inhibition by extracts from American and Chinese chestnut. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46(3): 199-213.
- **Geibel, M., Geiger, H. and Treutter, D. 1990.** Tectochrysin 5- and genistein 5-glucosides from the bark of *Prunus cerasus*. *Phytochemistry* 29: 1351-1353.
- **George, E.F. and P.D. Sherrington, 1984.** Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Ltd. Eversley, Basingstoke, England. 709 p.
- Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechn*. 20: 338–43.
- **Gerland, C. 2006.** Defectos aromáticos de los vinos en relación con la calidad de las uvas. http://www.verema.com/opinamos/articulos/articulo.asp?articulo=286
- **Giamoustaris, A. and Mithen, R. 1995.** The effect of modifying the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. oleifera) on its interaction with specialist and generalist pests. *Ann. Appl. Biol.* 126: 347–363.
- **Giamoustaris, A. and Mithen, R. 1997.** Glucosinolates and disease resistance in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. oleifera). *Plant Pathol*. 46: 271–275.
- Gil-ad, N., Bar-Nun, N., Noy, T., Mayer, A.M. 2000. Enzymes of *Botrytis cinerea* capable of breaking down hydrogen peroxide. *FEMS Microbiol. Lett.* 190: 121-126.

- **Gil-ad, N., Bar-Nun, N and Mayer, A.M. 2001.** The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities. *FEMS Microbiol. Lett.* 199 (1): 109-113.
- **Gil-ad, N. and Mayer, A.M. 1999.** Evidence for rapid breakdown of hydrogen peroxide by *Botrytis cinerea. FEMS Microbiol. Lett.* 176 (2): 455-461.
- Gilbert, R.D., Johnson, A.M. and Dean, R.A. 1996. Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48: 335-346.
- **Giulietti, A.M. and Ertola, R.J. 1999.** Biotechnological strategies for production of plants and secondary metabolites of pharmaceutical interest. *Acta Hort.* 502: 269-280.
- **Glauert, A.M., Dingle, J.T. and Lucy, J.A. 1962.** Action of saponin on biological cell membranes. *Nature* 196: 953–955.
- **Glenn, E., Meredith, F., Morrison III, W. and Bacon, C. 2003.** Identification of intermediate and branch metabolites resulting from biotransformation of 2-benzoxazolinone by *Fusarium verticillioides*. *App. Environ. Microbiol.* 69(6): 3165-3169.
- Goetz, G., Fkyerat, A., Métais, N., Kuns, M., Tabacchi, R., Pezet, R. and Pont, V. 1999. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* 52: 759-767.
- Gonen, L., Viterbo, A., Cantone, F., Staples, R.C. and Mayer, A.M. 1996. Effect of cucurbitacins on mRNA coding for laccase in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 42: 321-324.

- **Gorham, J. 1980.** The stilbenoids. En: Reinhold, L., Harbone, J.B. and T. Swain, T. (eds.). Progress in phytochemistry (Vol. 6). pp 203-252. Pergamon Press, New York,
- **Govrin E., and Levine, A. 2000.** The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10: 751-757.
- **Graham, T.L. 1995.** Cellular biochemistry of phenylpropanoids responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. En: Daniel, M. and Purkayastha, R.P. (eds.). Handbook of phytoalexin metabolism and action. pp. 85–116. Marcel Dekker, New York.
- Graham, T.L and Graham, M.Y. 2000. Defense potentiation and competency: redox conditioning effects of salicylic acid and genistein. En: Keen, N. and Stacey, G. (eds.). Plant Microbe Interact. (Vol. 5). APS Press, St. Paul.
- **Grassin, C. 1987.** Recherches sur les enzymes extracellulaires sécretées par *Botrytis cinerea* dans la baie du raisin. Applications oenologiques et phytopathologiques. Thèse de Doctorat de l'Université de Bordeaux I. France.
- **Grayer, R. J. and Harborne, J.J. 1994.** A survey of antifungal compounds from higher plants 1982–1993. *Phytochemistry* 37:19–42.
- **Greenhalgh, J.R. and Mitchell, N.D. 1976.** Involvement of flavor volatilesin resistance to downy mildew of wild and cultivated forms of *Brassica oleracea*. *New Phytologist*. 77: 391–398.
- **Griffin, D. H. 1994**. Fungal physiology. (2<sup>nd</sup>) Ed. John Wiley and Sons Publication, E.E.U.U. 458p.

- Guimaraes, R., Chetelat, R. and Stotz, H. 2004. Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* is dominant in hybrids with tomato, and involves induced hyphal death. *European J. Plant Pathol* 110: 13-23.
- **Gunata, Y.Z., Sapis, J.C. and Moutounet, M. 1987**. Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenoloxidases. *Phytochemistry* 26: 1573-1575.
- Guo, S.J, Falk, E., Kenne, L., Rönnberg, B. and Sundquist, BG. 2000. Triterpenoid saponins containing an acetylated branched D-fucosyl residue from *Quillaja* saponaria Molina. *Phytochemistry* 53: 861-868.
- **Guo, S.J. and Kenne, L. 2000a.** Structural studies of triterpenoid saponins with new acyl 539 components from *Quillaja saponaria* Molina. *Phytochemistry* 55: 419-428.
- **Guo, S.J. and Kenne, L. 2000b.** Characterization of some O-acetylated saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Phytochemistry* 54(6): 615-623.
- Guo, S.J., Kenne, L., Lundgren, L.N., Ronnberg, B. and Sundquist, B.G. 1998.

  Triterpenoid saponins from *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry* 48: 175-180.
- Gus-Mayer, S., Brunner, H., Schneider-Poetsch, H.A.W., Lottspeich, F., Eckerskorn, C., Grimm, R. and Rüdiger, W. 1994a. The amino acid sequence previously attributed to a protein kinase or a TCP1- related molecular chaperone and co-purified with phytochrome is a *O*-glucosidase. *FEBS Lett.* 347: 51-54.
- Gus-Mayer, S., Brunner, H., Schneider-Poetsch, H.A.W. and Rüdiger, W. 1994b.

  Avenacosidase from oat: purification, sequence analysis and biochemical characterization of a new member of the BGA family of β-glucosidases. Plant *MOI*. *Biol*. 26: 909-921.

- Gutierrez, M.C., Parry, A., Tena, M., Jarrín, J. and Edwards, R. 1995. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry* 38 (5): 1185-1191.
- Hain, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stocker, R.H. and Strenzel, K. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361: 153-156.
- **Halliwell, B. and Gutterridge, J.M.C. 1989.** Free radicals in biology and medicine. (Segunda ed.), Clarendon Press, Oxford.
- **Hamer, J., Howard, R., Chumley, G. and Valent, B. 1987.** A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* 239: 288-290.
- Hammer, P.E., Yang, S.F., Reid, M.S. and Marois, J. 1990. Postharvest control of *Botrytis cinerea* infections on cut roses using fungistatic storage atmospheres. *J. Americ. Soc. Horticult. Sci.* 115: 102-107.
- Hänβler, G. and Pontzen, R. 1999. Wirkung von fenhexamid auf die entwicklung von Botrytis cinerea. Pflanzenschutz-Nachr. Bayer 52: 162-180.
- **Hansen, H.N and Smith, R.E. 1932.** The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 22: 953-964.
- Haraguchi, H., Abo, T., Hashimoto, K. and Yagi, A. 1992. Action mode of antimicrobial altersolanol A in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56(8): 1221-1224.
- **Harborne, J.B. and Baxter, H. 1993**. Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants. Taylor and Francis, London. 337 p.

- **Harkin, J., Larsen, M. and Obst, J. 1974.** Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Micología* 66: 469-476.
- **Harris, J.E. and Dennis, C. 1976.** Antifungal activity of post-infectional metabolites from potato tubers. *Physiol. Plant Pathol.* 9: 155-165.
- **Harris, J.E. and Dennis, C. 1977.** The effect of post-infectional potato tuber metabolites and surfactants on zoospores of Oomycetes. *Physiol. Plant Pathol.* 11: 163-169 1977.
- **Hartmans, K.J., Diepenhorst, P., Bakker, W. and Gorris, L.G.M. 1995**. The use of carvone in agriculture, sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. *Ind. Crops Prod.* 4: 3-13.
- **Hausbeck, M.K. and Moorman, G.M. 1996.** Managing Botrytis in greenhouse-grown flower crops. *Plant Disease* 80: 1212-1219.
- Hayashi, K., Watanabe, M., Tanaka, T. and Uesugi, Y. 1996. Cyanide-insensitive respiration of phytopathogenic fungi demonstrated by antifungal joint action of respiration inhibitors. *Nihon Noyaku Gakkaishi (Pestic Sci)* 21: 399-403.
- **Hayes, W.J. and Laws, E.R. 1991.** Handbook of pesticide toxicology (Vol. 3). Classes of pesticides. Academic Press, Inc., New York, NY.
- **Heisey, R.M. 1996.** Identification of an allelopathic compound from *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) and characterization of its herbicidal activity. *Amer. J. Bot.* 83: 192-200.
- Hennebert, G.L. 1973. Botrytis and Botrytis-like genera. *Persoonia* 7: 183-204.
- **Henricks, L.M., Ekman, R. and von Weissenberg, K. 1979.** Bioassay of some resin and fatty acids with *Fomes annosus. Acta Academiae Aboensis Serb* 39: 1-7.

- Higuchi, R., Tokimitsu, Y., Fujioka, T., Komori, T., Kawasaki, T. and Oakenfull, D.G. 1987. Structure of desacylsaponins obtained from bark of *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry* 26: 229-235.
- **Higuchi, R., Tokimitsu, Y. and Komori, T. 1988.** An acylated triterpenoid saponin from *Quillaja Saponaria. Phytochemistry* 27: 1165-1168.
- Hilber, U.W., Baroffio, C., Siegfried, W. and Hilber-Bodmer, M., 1999. Antiresistance strategy for anilinopyrimidines used to control *Botryotinia fuckeliana* in Switzerland. En: Lyr, H., Russell, P., Dehne, H.-W. and Sisler, H.D. (eds.). Modern fungicides and antifungal compounds II. pp. 291-295. Intercept, Andover, UK.
- **Hilber, U.W. and SchuK epp, H. 1996a**. A reliable method for testing the sensitivity of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidines *in vitro. Pestic. Sci.* 47: 241-247.
- **Hilber, U.W. and SchuK epp, H. 1996b.** Mycelial growth test for assessment of anilinopyrimidine sensitivity of grey mould (*Botryotinia fuckeliana*). *EPPO Bull.* 26: 184-186.
- **Hilber, U.W., Schwinn, F.J. and SchuK epp, H. 1995**. Comparative resistance patterns of fludioxonil and vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*. *J. Phytopathol*. 143: 423-428.
- **Hipskind, J.D. and Paiva, N.L. 2000.** Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 551-562.
- Hisayuki, K. and Takashi, I. 1987. Antioxidant. JPatent 62243681 A.
- **Hoffmann, A. 1998.** Flora Silvestre de Chile, Zona Central. Edición 4. Fundación Claudio Gay, Santiago. 254p.

- Hoffmann, A., Farga, C., Lastra, J. y Veghazi, E. 1992. Plantas Medicinales de uso común en Chile. Segunda edición. Ediciones Fundación Claudio Gay. Santiago. Chile.
- **Honda, Y. and Mizumura, Y. 1991.** Light and temperature dependent conidium and sclerotium formation in Botrytis spp.. *Bulletin Faculty Agricult. Shimane Univ.* 25: 27-35.
- **Hostettmann, K. and A. Marston. 1994**. Saponins. En: Chemistry and pharmacology of natural products. pp. 240-291. Cambridge University Pres, London, England.
- Huang, Q. and Kúc, J. 1995. Cutin, cutinase and esterase as related to the induced systemic resistance of cucumber against *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46: 215-226.
- **Hughes, M.A. 1991**. The cyanogenic polymorphism in *Trifolium repens* L. (white clover). *Heredity* 66: 105-115.
- **Hunter, M.D. and Hull, L.A. 1993.** Variation in concentrations of phloridzin and phloretin in apple foliage. *Phytochemistry* 34: 1251-1254.
- **Ibañez, C. 1981.** Saponinas del quillay a mercados del mundo. [En línea]. <a href="http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%20%3E%20%2016&tc=3&nc=5&art=767.html">http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%20%3E%20%2016&tc=3&nc=5&art=767.html</a>. [Consulta: 20 de Enero del 2006].
- **Imloy, J.A. and Linn, S. 1988.** DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302-1304.
- **Inderjit and Dakshini, K. M. 1995.** On laboratory bioassays in allelopathy. *Botanical Review* 61: 28-44.

- **Ingham, J.L. 1978.** Isoflavonoid and stilbene phytoalexins of the genus *Trifolium. Biochem. System. Ecol.* 6(3): 217-223.
- **Ingham, J.L., Tahara, S. and Harborne, J.B. 1983.** Fungitoxic isoflavones from *Lupinus albus* and other *Lupinus species*. *Z. Naturforsch*. 38c: 194-200.
- **Inyang, E., Butt, T., Doughty, K., Todd, A. and Archer, S. 1999.** The effects of isothiocyanates on the growth of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its infection of the mustard beetle. *Mycol. Res.* 193: 974-980.
- **Ito, S., Nagata, A., Kai, T., Takahara, H. and Tanaka, S. 2005.** Symptomless infection of tomato plants by tomatinase producing *Fusarium oxysporum* formae speciales nonpathogenic on tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66 (5): 183-191.
- **Izhaki, I. 2002.** Emodin a secondary metabolites with multiple ecological functions in higher plants-Research review. *New Physiologist.* 155: 205-217.
- **Jacobsen, N.E., Fairbrother, W.J., Kensil, C.R., Lim, A., Wheeler, D.A. and Powell, M.F. 1996.** Structure of the saponin adjuvant QS-21 and its base-catalysed isomerization product by <sup>1</sup>H and natural abundance <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 280: 1-14.
- **Janisiewicz, W.J. and Korsten, L. 2002.** Biological control of postharvest diseases of fruits. *Ann. Rev. Phytopathol.* 40: 411-441.
- **Jarvis, W.R. 1977.** *Botryotinia* and *Botrytis* Species: taxonomy, physiology, and pathogenicity. Monograph 1. Research Branco, Canada Department of Agriculture, 195 p.
- **Jarvis, W.R. 1980.** Epidemmiology. En: Verhoeff, K. and Jarvis, W.R. The Biology of Botrytis. pp 219-250. Coley-Smith, J.R. Academic Press, London.

- Jeandet, P., Douillet, A., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. and Adrian, M. 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2731-2741.
- **Jejelowo, O.A., Conn, K.L. and Tewari, J.P. 1991.** Relationship between conidial concentration, germling growth, and phytoalexin production by *Camelina sativa* leaves inoculated with *Alternaria brassicae*. *Mycol. Res.* 95: 928–934.
- **Jimenez, L.D., Ayer, W.A. and Tewari, J.P. 1997.** Phytoalexins produced in the leaves of *Capsella bursa-pastoris* (shepherd's purse). *Phytoprotection* 78: 99–103.
- **Johnston, D.J., Ramanathan, V. and Williamson, B. 1993.** A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* and other microorganisms. *J. Exp. Bot.* 44(5): 971-976.
- **Johnston, D.J. and Williamson, B. 1992a.** Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 96:343-349.
- **Johnston, D.J. and Williamson, B. 1992b.** An immunological study of the induction of polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol*. *Lett.* 97:19-24.
- **Johnston, D.J., Williamson, B. and McMillan, G.P. 1994.** The interaction in planta of polygalcturonases from *Botrytis cinerea* with a cell-wall bound polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in raspberyy fruits. *J. Exp. Bot.* 45: 1837-1843.
- **Jones, G.E.R. 1994**. Fungal adhesion. *Mycol. Res.* 98(9): 961-81.
- **Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W. and Wood, P.M. 2001.** Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta.* 1504 (2-3): 179-95.

- **Josephson, M. and Brambl, R. 1980.** Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination. Purification, properties, and biosynthesis of cytocrome c oxidase from *Botryodiplodia theobromae*. *Biochim. Biophys. Acta* 606: 125-137.
- **Joyeux, A. Lafon-Lafourcade, S. and Ribereau-Gayon, P. 1984a.** Evolustion of acetic acid during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1): 153-156.
- **JP 7112939 Patente Japonesa. 1995.** Cellular immune potentiator for mammals and poultry-comprises bark extracts of *Quillaja saponaria* Molina.
- Kars, I. and van Kan, J.A.L. 2004. Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of Botrytis. En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski P. and Delen, N. (eds.). Botrytis: Biology, pathology and control. pp. 99-118. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
- Kato, T., Kabuto, C., Sasaki, N., Tsunagawa, M., Aizawa, H., Fujita, K., Kato, Y., Kitahara, Y. and Takahashi, N. 1973. Momilactones, growth inhibitors from rice, Oryza sativa L. Tetrahedron Lett. 14(39): 3861-3864.
- **Kato, H., Kodama, O. and Akatsuka, T. 1993.** Oryzalexin E, a novel diterpene phytoalexin from UV-irradiated rice leaves. *Phytochemistry* 33: 79-81.
- **Kensil, C. R. 1996.** Saponins as vaccine adjuvants. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 13: 1-55.
- **Kensil, C., Patel, U., Lennick, M., and Marciani, D. 1991.** Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunol.* 146: 431–437.

- **Kenyon, W.H., Duke, S.O., and Vaughn, K.C. 1985.** Sequence of effects of acifluorfen on physiological and ultrastructural parameters in cucumber cotyledon discs. *Pestic. Biochem. Physiol.* 24: 240-250.
- Keukens, E.A., De Vrije, T., Fabrie, C.H., Demel, R.A., Jongen, W.M. and De Kruijff, B. 1992. Dual specificity of sterol-mediated glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* 1110: 127–136.
- Keukens, E.A., de Vrije, T., van den Boom, C., de Waard, P., Plasmna, H.H., Thiel, F., Chupin, V., Jongen, W.M. and de Kruijff, B. 1995. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* 1240: 216-228.
- **Kim, W.G. and Cho, W.D. 1996.** Developmental characteristics of gray mold in pepper. *J. Agri. Sc. Crop Prot.* 38: 466-472.
- **Kim, S.H., Kang, S.S. and Kim, C.M. 1992.** Coumarin glycosides from the roots of *Angelica dahurica*. *Arch. Pharm. Res.* 15: 73–77.
- **Kindl, H. 2000.** Interplay *Botrytis*-plant: Plant stilbene synthase gene promoters responsive to *Botrytis*-made compounds and *Botrytis* chaperones sensitive to plant stilbene phytoalexins. Presented at the XIIth International *Botrytis* Symposium, Reims, France.
- **Kiso, A. 1988.** Epidemiology and fungicide control of gray mold, *Botrytis cinerea*, of vegetables in Japan. *Japan Pestic. Inform.* 52: 16-21.
- **Kite, G., Howes, M.J. and Simmonds, M. 2004.** Metabolomic analysis of saponins in crude extracts of *Quillaja saponaria* by liquid chromatography/mass spectrometry for product authentication. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 2859-2870.

- **Kodama, O., Suzuki, T., Miyakawa, J. and Akatsuka, T. 1988.** Ultraviolet-induced accumulation of phytoalexins in rice leaves. *Agric. Biol. Chem.* 52: 2469–2473.
- Koga, J., Shimura, M., Oshima, K., Ogawa, N., Yamauchi, T. and Ogasawara, N. 1995.
  Phytocassanes A, B, C, and D, novel diterpene phytoalexins from rice, *Oryza sativa*L. *Tetrahedron* 51: 7907–7918.
- **Kokubun, T. and Harborne, J. B. 1995**. Phytoalexin induction in the. sapwood of plants of the Maloidea (Rosacea): biphenyls or dibenzofurans. *Phytochemistry* 40: 427-431.
- **Kolattukudy, P.E. 1984.** Cutinases from fungi and pollen. En: Borgström, B. and Brockman, H. (eds.). Lipases. pp. 471–504. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- **Kolattukudy, P.E. 1981**. Structure, biosynthesis, and biodegradation of cutin and suberin. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 32:539-567.
- **Kolattukudy, P.E. 1985**. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 223-250.
- **Kolattukudy**, **P.E** .1987. Lipid-derived defensive polymers and waxes and their role in plant-microbe interaction. En: Stumpf, P.K. and Conn, E.E. (eds.). The Biochemistry of Plants (Vol. 9). pp 291–314. Academic Press, New York.
- **Köller, W. 1991.** The plant cuticle. En: Cole, G.T. and Hoch, H.C. (eds). The fungal spore and disease initiation in plants and animals. pp 219-246. Plenum Press, New York.
- **Köller, W., Allan, C.R. and Kolattukudy, P.E. 1982a.** Protection of *Pisum sativum* from *Fusarium solani* f. sp. pisi by inhibition of cutinase with organophosphorus pesticides. *Phytopathology* 72: 1425-1430.

- **Köller, W., Allan, C.R. and Kolattukudy, P.E. 1982b.** Role of cutinase and cell wall degrading enzymes in infection of *Pisum sativum* by *Fusarium solani* f. sp. pisi. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 47-60.
- **Köller, W., Allan, C.R. and Kolattukudy, P.E. 1982c**. Inhibition of cutinase and prevention of fungal penetration into plants by benomyl A possible protective mode of action. *Pest. Biochem. Physiol.* 18 (1): 15-25.
- **Köller, W., Parker, D.M. and Becker, C.M. 1991.** The role of cutinase in penetration of apple leaves by *Venturia inaequalis. Phytopathology* 81: 1375-1379.
- **Köller W., and Parker, D. M. 1989.** Purification and characterization of cutinase from *Venturia inaequalis. Phytopathology* 79: 278-283.
- **Köller, W., Trail, F. and Parker, D.M. 1990.** Ebelactones inhibit cutinases produced by fungal plant pathogens. *The Journal of Antibiotics* 43: 734-735.
- Köller, W., Yao, C.H., Trial, F. and Parker, D. 1995. Role of cutinase in the invasion of plant. *Can. J. Bot.* 73 (suppl. 1): S1109-S1118.
- **Kooryama, T., and Chiba, I. 1996.** Oxidation-stable emulsions of oil and fats with transparent appearance and food containing them. JPatent 9651928 A2.
- **Kruse, M., Strandberg, M. and Strandberg, B. 2000.** Ecological Effects of Allelopathic Plants a Review. National Environmental Research Institute, Silkeborg, Denmark. 66 pp. NERI Technical Report No. 315.
- **Kúc, J. 1992.** Antifungal compounds in plants. En: Nigg, H.N. and Seigler, D. (eds.) Phytochemical resources for medicine and agriculture. pp. 159-184. .New York: Plenum Press.

- **Kúc, J. 1995.** Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:275-297.
- Kuck, K.H., KruK ger, B.W., Rosslenbroich, H.J. and Brandes, W. 1997. KBR2738\* nouveau fungicide de la famille des hydroxyanilides, active sur *Botrytis cinerea* et *Monilinia* spp. En: ANPP Cinquième conference internationale sur les maladies des plantes, Tours 3-4-5 Dècembre. pp. 1055-1062.
- **Kuhn, P.J. and Hargreaves, J.A. 1987.** Antifungal substances from herbaceous plants. En: Pegg, G.F. and Ayres, P.G. (eds.). Fungal infection of plants. pp. 193-218. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- **Lafon-Lafourcade**, S. and Peynaud, E. 1974. Sur l'action antibacterienne de l'anhidride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée. *Conn. Vigne Vin* 8: 187-203.
- Lagos Escalona, Carol. 2003. Caracterización de la actividad antifúngica y del mecanismo de acción de derivados de antraquinonas y antrahidroquinonas sintéticas sobre el hongo *Botrytis cinerea*. Tesis para optar al título de Bioquímico de la Universidad de Santiago de Chile.
- **Lambers, H., Chapin, F.S. III. and Pons, T.L. 2000.** Plant physiological ecology. Springer-Verlag, New York Inc. 539p.
- Lambowitz, A.M., Sabourin, J.R., Bertrand, H., Nickels, R. and McIntosh, L. 1989. Immunological identification of the altenative oxidase of *Neurospora crussa* mitochondria. *Mo1. Cell Biol.* 9: 1362-1364.
- **Langcake, P. 1981.** Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon-viniferin, alpha-viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* 18: 213-226.

- Langcake, P. and Pryce, R.J. 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9: 77-86.
- **Lara, A. 1997.** Catastro de vegetación nativa, la fuerza de los resultados. *Bosque Nativo* 15: 32-35.
- **Latorre, B.A. 1986.** Manejo de *Botrtyis cinerea* en uva de mesa. *Revista Frutícola (Chile)* 7: 75-88.
- Latorre, B.A. 1989. Resistencia a los fungicidas, fundamentos y aspectos prácticos. En: Latorre, B. (ed..). Fungicidas y Nematicidas. pp. 17-25, 125-132. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Universidad Católica de Chile, Santiago.
- **Latorre**, **B.A. 1997.** El pronóstico de la pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en uva de mesa. En: Esterio, M. y Auger, J. (edts.). Botritis, nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. pp. 10-13. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile, Santiago.
- **Latorre, B.A. 2004.** Enfermedades de las plantas cultivadas. (6ª ed. ampliada). Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile. 638 p.
- Latorre, B.A., Flores, V., Sara, A.M. and Roco, A. 1994. Dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile: survey and characterization. *Plant Dis.* 7: 990-994.
- Latorre, B.A, Lillo, C. y Rioja, M. 2001. Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. *Cien. Inv. Agr.* 28(2): 61-66.

- **Latorre**, **B.A.** y **Rioja**, **M. 2002.** Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. *Cien. Inv. Agr.* 29 (2): 67-71.
- Latorre, B.A., Rioja, M.E. y Lillo, C. 2002. Efecto de la temperatura en el desarrollo de la infección producida por *Botrytis cinerea* en flores y bayas de uva de mesa. *Cien. Inv. Agr.* 29 (3): 145-151.
- **Latorre, B.A. y Vásquez, G. 1996.** Situación de *Botrytis cinerea* latente en uva de mesa de la zona Central. *Aconex (Chile)* 52:16-21
- Latorre, B., Agosin, E., Martin, R., Vásquez, G. y San Martín, R. 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against Botrytis bunch rot of table grapes in Chile. *Crop Prot.* 16: 209-214.
- Lee, S.H., Chang, K.C., Su, M.S., Huang, Y.S. and Jang, H.D. 2007. Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *Food Control.* (*In Press*)
- **Lee, H.J., Choi, G.J. and Cho, K.Y. 1998.** Correlation of lipid peroxidation in *Botrytis cinerea* caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity. *J. Agric. Food Chem.* 46: 737-741.
- **Leroux, P. 1996**. Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pestic. Sci.* 47: 191-97.
- **Leroux, P. 2004.** Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds.). Botrytis: biology, pathology and control. pp. 195-222. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic.
- **Leroux, P. and Gredt, M. 1995.** Etude *in vitro* de la résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides anilinopyrimidines. *Agronomie* 15: 367-370.

- **Letessier, M., Svoboda, K. and Walters, D. 2001.** Antifungal activity of the essential oil of hyssop (*Hyssopus officinalis*). *J. Phytopathology* 149: 673-679.
- **Leung, A.Y. 1980.** Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, drugs, and cosmetics, New York: John Wiley & Sons.
- **Levieux, A., Levieux, D. and Lab, C. 1991.** Immunoquantitation of rat erythrocyte superoxide dismutase: its use in copper deficiency. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 589-595.
- **Levin, D.A. 1976.** The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Ann Rev. Ecol. Syst.* 7: 121-159.
- **Lindsey, K. and Jones, M. 1989.** Plant biotechnology in agriculture. Open University Press. U.S.A. 276 p.
- **Linskens, H.F. and Haage, P. 1963.** Cutinase-Nachweis in phytopathogene Pilzen. *Phytopathol. Z.* 48: 306-311.
- **Liochev, S. I. and Fridovich, I. 1994**. The role of O<sup>2</sup> in the production of HO<sup>-</sup>: *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biol. Med.* 16: 29-33.
- Lozovaya, V., Lygin, A., Zernova, O., Li, S., GL and Widholm, J.M. 2004. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiol*. *Biochem*. 42(7-8): 671-679.
- **Lüning, H.U. and Schlösser, E. 1975.** Role of saponins in antifungal resistance V. Enzymatic activation of avenacosides. Z. *Pflanzenkrankh*. *Pflanzenschutz* 82: 699-703.

- **Lyr, H. and Edlich, W. 1986.** Lipid peroxidation, a consequence of the mechanism of action of aromatic hydrocarbon and dicarboximide fungicides and a side effect in DMI fungicides. *Proc. Br. Crop Prot. Conf. Pests Dis.* 1: 879.
- Macías, F.A., Galindo, J.G.C and Molinillo, J.M. 1998. Plant biocomunicators: Application of allelopathic studies. En: Allelopathy in rice. *Proceedings of the Workshop on Allelopathy in Rice*, 25-27 Nov 1996. (ed. M. Olofsdotter), pp. 69-79. IRRI Press, Manilla.
- **Maddock, S.E. 1979.** Studies of the biology of the light leaf spot disease of oilseed rape and other brassicas. PhD Thesis, University of Cambridge, U.K.
- **Malolepsza, U. 2004.** The influence of o-hydroxyethylorutin on *Botrytis cinerea* oxidant-aAntioxidant activity. *J. Phytopathology* 152: 122-126.
- **Malti, I.B. and Kolattukudy, P.E. 1979.** Prevention of fungal infection of plants by specific inhibitors of cutinase. *Science* 205: 507-508.
- **Mansfield, J.W. 1983.** Antimicrobial compounds. En: Callow, J.A. (ed). Biochemical Plant Pathology. pp. 237-265. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B. and Legendre, L. 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol*. *Ecol*. 43: 359-366.
- **Marbach, I., Harel, E. and Mayer, A. M. 1985.** Pectin, a second inducer for laccase production by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 24: 2559–2561.
- Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., Romagnoli, C. 2004. Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum. Microbiol. Res.* 159(3): 295-304.

- Mari, M., Guizzardi, M. and Pratella, G.C. 1996. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biol. Control* 7 (1): 30–37.
- **Marnett, L.J. 2002.** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 181: 219-222.
- Marois, J.J., Redmond, J.C. and MacDonald, J.D. 1988. Quantification of the impact of environment on the susceptibility of *Rosa hybrida* flowers to *Botrytis cinerea*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 842-845.
- Marston A., Gafner F., Dossaji S.F. and Hostettmann K. 1988. Fungicidal and molluscicidal saponins from *Dolichos kilimandscharicus*. *Phytochemistry* 27: 1325-1326.
- Massardo, F., Zúniga, G., Pérez, L. and Corcuera, L. 1994. Effects of hydroxamic acids on electron transport and their cellular location in corn. *Phytochemistry* 35: 873-876.
- **McGrath, M.T. and Shishkoff, N. 1999.** Evaluation of biocompatible products for managing cucurbit powdery mildew. *Crop Prot.* 18: 471-478.
- Meepagala, K., Kuhajek, J., Strurtz, G. and Wedge, D. 2003. Vulgarone B, the antifungal constituent in the stem-distilled fraction of *Artemisia douglasiana*. *J. Chem. Ecol.* 29(8): 1771-1780.
- Melton, R.E., Flegg, L.M., Brown, J.K.M., Oliver, R.P., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E. 1998. Heterologous expression of *Septoria lycopersici* tomatinase in *Cladosporium fulvum*: effects on compatible and incompatible interactions with tomato seedlings. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 228-236.
- **Mendger, K. and Deising, H. 1993.** Infection structures of fungal plant pathogens-a cytological and physiological evaluation. *New Phytol.* 124: 193-213.

- **Mendger, K., Hahn, M. and Deising, H. 1996.** Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 34: 367-386.
- **Millar, A.H. and Day, D.A. 1996.** Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* 398: 155-158.
- **Miller, G.L. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- **Milling, R.J. and Richardson, C.J. 1995**. Mode of action of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. 2. Effects on enzyme secretion in *Botrytis cinerea*. *Pestic*. *Sci*. 45: 43-48.
- Minamikawa, T., Akazawa, T. and Uritani, I. 1964. Two glucosides of coumarin derivatives in sweet potato roots infected by *Ceratocystis fibriata*. *Agr. Biol. Chem.* 28: 230-233.
- **Minamikawa, T., Yamauchi, D., Wada, S. and Takeuchi, H. 1992.** Expression of α-amylase in *Phaseolus vulgaris* and *Vigna mungo* plants. *Plant Cell Physiol*. 33: 253-258.
- Mitani, S., Araki, S., Takii, Y., Ohshima, T., Matsuo, N. and Miyoshi, H. 2001. The biochemical mode of action of the novel selective fungicide cyazofamid: Specific inhibition of mitochondrial complex III in *Phythium spinosum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 71(2): 107-115.
- **Mithen, R. 1992.** Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape. *Euphytica* 63: 71–83.
- Mithen, R.F., Lewis, B.G. and Fenwick, G.R. 1986. *In vitro* activity of glucosinolates and their products against *Leptosphaeria maculans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 87: 433-440.

- Miura, I., Kamakura, T., Maeno, S., Hayashi, S. and Yamaguchi, I. 1994. Inhibition of enzyme secretion in plant pathogens by mepanipyrim, a novel fungicide. *Pestic. Biochem. Physiol.* 48: 222-228.
- **Mizobuchi, S. and Sato, Y. 1984.** A new flavanone with antifungal activity isolated from hops. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2771-2275.
- Mizutani, A., Miki, N., Yukioka, H., Tamura, H. and Masuko, M.A. 1996. A possible mechanism of control of rice blast disease by a novel alkoxyiminoacetamide fungicide, SSF126. *Phytopathology* 86: 295-300.
- Molina-Mercader, G., Zaldua-Flores, S., Gonzalez-Vargas, G. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque* (Valdivia) 27(2): 126-134.
- Monde, K., Oya, T., Shirata, A. and Takasugi, M. 1990. A guaianolide phytoalexin, cichoralexin from *Cichorium intybus*. *Phytochemistry* 29(11): 3449-3451.
- Montenegro, G. 2002. Chile: Nuestra flora útil. Guía de uso apícola, medicinal folclórica, artesanal y ornamental. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Ediciones Universidad Católica. Santiago. Chile. 267p.
- **Morales, A. y Nualart. J. 1995.** Evaluación de diferentes fungicidas y formulaciones en el control de *Botrytis cinerea* en uvas de mesa. *Aconex* 48: 26-30.
- **Mordue** (Luntz), A.J. and Blackwell, A. 1993. Azadiracht: an update. *J. Insect Physiol.* 39: 903–924.
- **Morrissey, J. and Osbourn, A. 1999.** Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (3): 708-724.

- **Movahedi, S. and Heale, J.B. 1990.** The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 36: 303-324.
- Moya, E.A., 2003. Evaluación comparativa de un extracto de quillay con productos alternativos para el control de oídio y el uso del software ArcView GIS 3.2 en la evaluación de la severidad causada por esta enfermedad. Tesis presentada como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Vegetales, Programa de Postgrado en Ciencias de la Agricultura, Dirección de Investigación y Postgrado, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, 64p.
- Muckenschnabel, I., Goodman, B. A., Williamson, B., Lyon, G. and Deighton, N. 2002. Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *J. Exp. Bot.* 53(367): 207-214.
- Müller-Riebau, F., Beger, B. and Yegen, O. 1995. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2262-2266.
- Muñoz, G., Hinrichsen, P. and Brygoo, Y. 2002. Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycol. Res.* 106: 594-601.
- **Murashige, T., Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473 497.
- **Murray, R.D.H., Mendez, J. and Brown, S.A. 1982.** The natural coumarins (first ed.). pp. 555–559. John Wiley and Sons Inc., New York.

- Nagata, T., Tsushida, T., Hamaya, E., Enoki, N., Manabe, S. and Nishino, C. 1985. Camellidins: antifungal saponins isolated from *Camellia japonica*. *Agric. Biol. Chem.* 49(4): 1181-1186.
- **Natural Response, 2004.** Utilización de los extractos de quillay. En: Seminario quillay, manejo sustentable y certificación internacional. Santiago. Chile. 5p.
- **Nelson, N.A. 1944.** A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem* 153: 375-380.
- **Newman, M. 1992.** Immunogenicity and toxicity testing of an experimental HIV-1 vaccine in nonhuman primates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 1413-1418.
- Nicholson, R., Kollipara, S., Vincent, J., Lyons, P.C. and Cadena-Gomez, G. 1987.

  Phytoalexin synthesis by the Sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84(16): 5520-5524.
- **Niemeyer, H.M. 1988a**. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defense chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry* 27: 267-292.
- **Niemeyer, H.M. 1988b**. Hydroxamic acid content of *Triticum* species. *Euphytica* 37: 289-293.
- **Niemeyer, H.M. and Jerez, J.M. 1997.** Chromosomal location of genes for hydroxamic acid accumulation in wheat using wheat aneuploids and wheat substitution lines. *Heredity* 79: 10-14.
- Nishikawa, M., Nojima, S., Akiyama, T., Sankawa, U. and Inoue, K. 1984. Interaction of digitonin and its analogs with membrane cholesterol. *J. Biochem. Tokyo* 96: 1231-1239.

- **Nisius, H. 1988.** The stromacentre in Avena plastids: an aggregation of β-glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta* 173: 474-481.
- **Nord, L. and Kenne, L. 1999.** Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Res.* 320: 70–81.
- **Nord, L. and Kenne, L. 2000.** Novel acetylated triterpenoid saponins in a chromatographic fraction from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Res.* 329(4): 817-829.
- Nord, L., Kenne, L. and Jacobson, S. 2001. Multivariate analysis of 1 H NMR spectra for saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Anal. Chim. Acta* 446: 199–209.
- Nuss, L., Mahé, A., Clark, A.J., Grisvard, J., Dron, M., Cervone, F. and De Lorenzo, G. 1996. Differential accumulation of PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein) mRNA in two near-isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* L. upon infection with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48 (2): 83-89.
- **Nyberg, N.T., Kenne, L., Ronnberg, B. and Sundquist, B.G. 2000.** Separation and structural analysis of some saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Res.* 323: 87-97.
- **Ochoa-Alejo, N. 1990.** Establecimiento de cultivos *in vitro*. En: Rossell, C.H. y Villalobos, V.M. (eds). Fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. pp 23-27. Roma: FAO.
- **Ohtani, K., Mavi, S. and Hostettmann, K. 1993.** Molluscicidal and antifungal triterpenoide saponins from *Rapanea melanophloeos* leaves. *Phytochemistry* 33(1): 83-86.
- Olivera-Ortega, V., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Gutiérrez-Espinosa, J.A. and Andrade-Rodríguez, M. 2000. Cultivo *in vitro* de Gerbera (*Gerbera jamesonni* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro* 12(3): 75-80.

- **Oosterhaven, J. 1995.** Different aspects of S-carvone a natural potato sprout growth inhibitor. Thesis, Landbouwuniversiteit, Wageningen, Cip-data Konin Klije Bibliotheek Den Haag, 152 p. ISBN 90-5485-435-9.
- **Osbourn, A.E. 1996a.** Performed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Osbourn, A.E. 1996b. Saponins and plant defense a soap story. Trends Plant Sci. 1(1): 4-6.
- **Osbourn, A.E. 1999.** Review Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Gen. Biol.* 26: 163-168.
- Osbourn, A.E., Clarke, B.R., Dow, J.M. and Daniels, M.J. 1991. Partial characterization of avenacinase from *Gaeumannomyces graminis* var. avenae. *Physiol. MOI. Plant Pathol.* 38: 301-312.
- Osbourn, A.E, Clarke, B.R., Lunness, P., Scott, P.R. and Daniels, M.J. 1994. An oat species lacking avenacin is susceptible to infection by *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45: 457-467.
- **Ough, C.S. and Crowell, E.A. 1987.** A study of histamine production by various wine bacteria in model solutions and in wine. *J. Food Proc. Preserv.* 12: 63-70.
- **Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K.V. and Reddy, A.R. 1977.** Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry* 46(3): 499-502.
- Papadopoulou, K., Melton, R., Leggett, M., Daniels, M. and Osbourn, A. 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *PNAS* 96(22): 12923-12928.

- **Patsoukis, N. and Georgiou, C. 2007.** Effect of sulfite–hydrosulfite and nitrite on thiol redox state, oxidative stress and sclerotial diVerentiation of Wlamentous phytopathogenic fungi. *Pest. Biochem. Physiol.* 88: 226–235.
- **Paulitz. T. and Bélanger, R. 2001.** Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 103-133.
- **Pearson, R.C. and Goheen, A.C. 1988.** Compendium of grape diseases. American Mycological Society, APS Press, St. Paul.
- **Pedras, M.S. and Ahiahonu, P.W.K. 2004.** Phytotoxin production and phytoalexins elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum. J. Chem. Ecol.* 30: 2163–2179.
- **Pedras, M.S., Chumala, P.B. and Suchy, M. 2003.** Phytoalexins from *Thlaspi arvense*, a wild crucifer resistant to virulent *Leptosphaeria maculans*, structures, synthesis and antifungal activity. *Phytochemistry* 64: 949-956.
- **Pedras, M.S. and Jha, M. 2006.** Toward the control of *Leptosphaeria maculans*: Design, syntheses, biological activity, and metabolism of potential detoxification inhibitors of the crucifer phytoalexin brassinin. *Bioorg. Med. Chem.* 14(14): 4958-4979.
- **Pedras, M.S., Montaut, S. and Suchy, M. 2004.** Phytoalexins from the crucifer rutabaga: structures, syntheses, biosyntheses and antifungal activity. *J. Org. Chem* 69: 4471–4476.
- **Pedras, M.S., Okanga, F.I., Khan, A.Q. and Zaharia, I.L. 2000.** Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry* **53**: 161–176.

- **Pedras, M.S., Sarwar, M.G., Suchy, M. and Adio, A.M. 2006.** The phytoalexins from cauliflower, caulilexins A, B and C: Isolation, structure determination, syntheses and antifungal activity. *Phytochemistry* 67 (14): 1503-1509.
- **Pedras, M.S., Sorensen, J.L, Okanga, F.I. and Zaharia, I.L. 1999.** Wasalexins A and B, new phytoalexins from wasabi: isolation, synthesis, and antifungal activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (20): 3015-3020.
- **Pelah, D., Abramovich, Z., Markus, A. and Wiesman, Z. 2002.** The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes* and *Culex pipiens. J. Ethnopharmacol.* 81(2): 407-409.
- **Peng, G. and Sutton, J. 1991.** Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry. *Can. J. Plant Path.* 13: 247-257.
- **Perez-Gastell, P.L y Perez de Alejo, J.L. 2000.** Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev. Cub. Med. Mil.* .29 (3) 192-198.
- **Pezet, R. 1998.** Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *FEMS Microbiol. Lett.* 167(2): 203-208.
- **Pezet, R. and Pont, V. 1990.** Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea* Pers. *J. Phytopathol.* 129: 29-30.
- **Pezet, R. and Pont, V. 1992.** Differing biochemical and histological studies of two grape cultivars in the view of their respective susceptibility and resistance to *Botrytis cinerea*. En: Verhoeff, K., Malathrakis, N. E. and Williamson, B. (eds.). Recent Advances in Botrytis Research. 10th International Botrytis Symposium, Heraklion, Crete, Greece, April 5-10.

- **Pezet, R., Pont, V. and Hoang-Van, K. 1991.** Evidence for oxidative detoxification of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 441-450.
- Pierik, R.L. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Mundi-Prensa, Madrid.
- **Piva, A. y Di Pillo, L. 1994.** Modificazioni della composizione di uve botritizzate. *Informatore Fitopatológico*. 11: 18-21.
- **Pommer, E.H. and Lorenz, G. 1982.** Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides- a literature review. *Crop Prot.* 1: 221-230.
- **Poulton, J.R. 1970.** Chemical protection of wine against oxidation. *Die Wynboer* 466: 22-23.
- **Poulton, J.E. 1988.** Localization and catabolism of cyanogenic glycosides. *Ciba. Found Symp.* 140: 67-91.
- Poulton, J.E. 1990. Cyanogenesis in plants. Plant Physiol. 94: 401-405.
- Powell, A.L., van Kan, J., ten Have, A., Visser, J., Greve, L.C., Bennett, A.B. and Labavitch, J.M. 2000. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol. Plant Microbe Interact*. 13: 942-950.
- **Prado, D.J. and Aguirre, A.S. 1987**. Equations for estimating total biomass and components of *Quillaja saponaria*. *Cien. Invest. Forestal* 1(1): 41-47.
- **Prats, E., Bazzalo, M.E., León, A. and Jorrín, J.V. 2006.** Fungitoxic effect of scopolin and related coumarins on *Sclerotinia sclerotiorum*. A way to overcome sunflower head rot. *Euphytica* 147(3): 451-460.

- **Prehn, D., Serrano, C., Berrios, C.G. 2003.** Micropropagación de *Quillaja saponaria* Mol. a partir de semillas. *Bosque* (*Valdivia*) 24(2): 3-12.
- **Price, K.R., Johnson, I.T. and Fenwick, G.R. 1987.** The chemistry and biological significance of saponins in food and feedingstuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 26: 27-133.
- Pulgar, C. 1988. Evaluación de la actividad alelopática de extractos de chamico (*Datura stramonium* L.) cultivados in vivo e in vitro. Tesis de pregrado, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.
- **Purdy, R.E. and Kolattukudy, P.E. 1973.** Depolymerization of a hydroxyfatty acid biolpolymer, cutin, by extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. sp. pisi: isolation and some properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 61-69.
- **Quidde, T., Osbourn, A.E. and Tudzynski, P. 1998.** Detoxification of α-tomatine by *Botrytis cinerea. Physiol. Mol. Plant Path.* 52: 151-165.
- **Ramachandra Rao, S. and G.A. Ravishankar. 2002.** Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20: 101-153.
- Ramage, C. M. and Williams, R. R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 38: 116-124.
- Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdés, L., Virgen-Calleros, G. y Molina-Torres, J. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotinium*. *Agrociencia* 34: 207-215.
- Reignault, P., Mercier, M., Bompeix, G. and Boccara, M. 1994. Pectin methylesterase from *Botrytis cinerea*: physiological, biochemical and inmunochemical studies. *Microbiology* 140: 3249-3255.

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D. Doneche, B., Lonvaud, A., Glories, Y. Bertrand, A. and Maujean, A. 1998. Traité d'Œnologie. 2 Toms, Ed. Dunod, París.
- **Rice, E.L. 1987.** Allelopathy: an overview. En: Waller, G.E. Allelochemicals: role in agriculture and forestry. pp. 8-22. Oklahoma state university. American chemical society, Washinton, DC.
- **Richardson, M.D. and C. W. Bacon. 1995.** Catabolism of 6-methoxybenzoxazolinone and 2-benzoxazolinone by *Fusarium moniliforme*. *Mycologia* 87: 510-517
- **Robinson, T. 1983.** The organics constituents of higher plants. (Fifty edition). Published by: Cordus Press. P.O. Box 587. North Amherst, MA 01059. 353p.
- Roca, W.N. and Mroginski, L.A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali. Colombia.
- Rodriguez-Tudela, J. L., Barchiesi, F. and Bille, J. 2003. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiol. Infect.* 9: i–viii.
- Rodríguez, R., Matthei, O. and Quezada, M. 1983. Flora Arbórea de Chile. Ed. Univ. Concepción. 408 p.
- Romagnoli, C.; Bruni, R.; Andreotti, E.; Rai, M. K.; Vicentini, C. B. and Mares, D. 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L., Protoplasma 225(1-2): 57-65.
- **Romano, P. and Suzzi, G. 1993.** Sulfur dioxide and wine microorganisms. En: Fleet, G.H. (ed.). Wine Microbiology and Biotechnology. pp. 373-393. Harwood Academic Publishers, Chur, Suiza.

- **Rosende, R. 1990.** Producción secundaria de especies de bosques esclerófilos y espinosos. En: Opciones silviculturales de los bosques esclerófilos y espinosos de la zona central de Chile. Apuntes Docentes Nº 3. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Departamento de Silvicultura. Santiago. Chile. pp.126-141.
- **Rosslenbroich, H.J. 1999.** Efficacy of fenhexamid (KBR 2739) against *Botrytis cinerea* and related fungal pathogens. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 52(2): 127-144.
- Rosslenbroich, H.J., Brandes, W., Kreuger, B.W., Kuck, K.H., Pontzen, R. and Stenzel, K., Suty, A. 1998. Fenhexamid (KBR-2738) A novel fungicide for control of *B. cinerea* and related pathogens. Pest and Diseases-The Brighton Crop Protection Conference, Proceedings 2: 327-334.
- **Rosslenbroich, H.J. and Stuebler, D. 2000.** *Botrytis cinerea* History of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Prot.* 19: 557-561.
- Roth, B.L, Poot, M., Yue, S.T and Millard, P.J. 1997. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX Green nucleic acid stain. *J. Appl. Environ Microbiol.* 63: 2421-2431.
- **Ruhland, C.T. and T.A. Day. 2000.** Effects of ultraviolet-B radiation on leaf elongation, production and phenylpropanoid concentrations in *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis* in Antarctica. *Physiol. Plant.* 109: 244-251.
- Ruiz de Gamboa, C. 1986. Proposición de superficies y especies para forestar con fines energéticos en la Provincia de Choapa, IV Región. Memoria Ingeniero Forestal.
  Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Escuela de Ciencias Forestales. Departamento de Silvicultura. Santiago. Chile. 104p.
- **Saeedi, S. and Roblin, G. 1986**. Effects of respiration inhibitors and uncouplers on dark- and light-Induced leaflet movements of *Cassia fasciculate*. *Plant. Physiol*. 82(1): 270-273.

- Sajc, L., Grubisic, D. and Vunjak-Novakovic, G. 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochem. Eng. J.* 4: 89-99.
- Salah, M.A., Bedir, E., Tayang, N.J., Khan, I. A., Harries M.D. and Wedge, D.E. 2003.

  Antifungal clerodane diterpenes from *Macaranga Monandra* (L) Muell. et Arg. (Euphorbiaceae). *J. Agric. Food Chem.* 51: 7607-7610.
- **Salinas, J. 1992**. Function of cutinolytic enzymes in the infection of Gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. PhD. Thesis, University of Utrecht, Utrecht.
- Salinas, J., Glandorf, D.C.M., Picavet, F.D. and Verhoeff, K. 1989. Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Neth. J. Pl. Path.* 95: 51-64.
- **Salinas, J. and Verhoeff, K. 1995**. Microscopical studies on the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol*. 101: 377-386.
- **Salinas, J. Warnaar, F. and Verhoeff, K. 1986.** Production of cutin hydrolyzing enzymes by *Botrytis cinerea in vitro. J. Phytopathol.* 116: 299-307.
- Salvi, G., Giarrizzo, F., De-Lorenzo, G. and Cervone, F. 1990. A polygalacturonase-inhibiting protein in the flowers of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Plant Physiol.* 136: 513-518.
- **Sanfuentes, E. and Ferreira, F. 1997.** Avaliação de fungos para biocontrole de *Botrytis cinerea* em viveiros suspensos de eucalipto. *Revista Árvore* 21(1):147-153.
- San Martín, R. 2000. Usos y el mercado del quillay. En: Seminario-Taller. El quillay una alternativa económica: Antecedentes para su comercialización, cultivo y manejo forestal. Manejo Forestal y Uso Industrial del quillay. Proyecto FONDEF D971-2010. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile. 6p.

- San Martín, R. and Briones, R. 1999. Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja* saponaria saponins. *Economic Botany* 53: 302-311.
- San Martín, R y Briones, R. 2000. Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *J. Sci. Food Agri.* 80: 2063-2068.
- **Satdive, R., Fulzele., D. and Eapen, S. 2007.** Enhanced production of azadirachtin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization. *J. Biotechn.* 128(2): 281-289.
- **Sayaverdra-Soto, L.A. and Montgomery, M.W. 1986.** Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. *J. Food Sci.* 51: 1531-1536.
- **Sbaghi, M., Jeandet, P., Bessis, R. and Leroux, P. 1996**. Metabolism of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathol*. 45: 139-145.
- **Schilder, A., Gillet, J., Sysak, R. and Wise, J. 2002.** Evaluation of environmentally friendly products for control of fungal diseases of grapes. Proceedings of the 10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture, Weinsberg, Germany. Weinsburg, Germany: FOKO, 163–167.
- Schmitt, A., Kunz, S., Nandi, S., Seddon, B. and Ernst, A. 2002. Use of *Reynoutria sachalinensis* plant extracts, clay preparations and *Brevibacillus brevis* against fungal diseases of grape berries. Proceedings of the 10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture Weinsberg, Germany. Weinsburg, Germany: FOKO, 146–151.

- **Schoene, P. and Kohl, J. 1999.** Biological control of *Botrytis cinerea* by *Ulocladium atrum* in grapevine and Cyclamen. *Gesunde Pflanzen* 51: 81-85.
- **Schoene, P., Oerke, E.C. and Dehne, H.W. 2000.** A new concept for integrated control of grey mould (*Botrytis cinerea*) in grapevine. En: Proceedings of the Brighton Conference: Pests and Diseases. pp. 1031-1036. Farnham, UK: BCPC.
- **Schönbeck, F. and Schlösser, E. 1976.** Preformed substances as potential protectants. En: Heitefuss, R. and Williams, P.H. Physiological Plant Pathology. pp. 653-678. Spinger-Verlag.
- **Schroeter, L.C. 1966.** Sulfur dioxide application in foods, beverages and pharmaceuticals. New York Pergamon Press. New York.
- **Seeman, P., Cheng, D. and Iles, G.H. 1973.** Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *J. Cell Biol.* 56: 519-527.
- **Segal, R. and Schlösser, E. 1975.** Role of glycosidases in the membranlytic, antifungal actions of saponins. *Arch. Microbiol.* 104: 147-150.
- **Serazetdinova, L., Oldach, K.H. and Lörz, H. 2005.** Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *J. Plant Physiol.* 162(9): 985-1002.
- Sergeeva, V., Nair, N.G., Verdanega, J.R., Shen, C., Barchia, I. and Spooner Hart, R. 2002. First report of anilinopyrimidine-resistant phenotypes in *Botrytis cinerea* on grapevines in Australia. *Aus. Plant Pathol.* 31: 299–300.
- **Shimoni, M., Reuveni, R. and Ravid, U., 1993.** Growth inhibition of plant pathogenic fungi by essential oils. *Hassadeh* 74(3): 306-308.

- Shishiyama, J., Araki, F. and Akai, S. 1970. Studies on cutin-esterase II. Characteristics of cutin-esterase from *Botrytis cinerea* and its activity on tomato-cutin. *Plant Cell Physiol.* 11: 937-945.
- **Siedow, J.N. 1995.** Bioenergetics, the mitochondrial electron transfer chain. En: C.S. Levings, C.S and Vasil, I.K. (eds.). The molecular biology of plant mitochondria. pp. 281–312. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- **Siedow, J.N. and Umbach, A.L. 1995.** Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell* 7: 821-831
- Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, J.C., y Rodríguez, D. 2002. Insecticidas vegetales, Una vieja-nueva alternativa en el control de plagas. *Revista Manejo Integrado de Plagas* (CATIE) (en prensa).
- **Singh, H., Batish, D. and Kohlil, R. 2003.** Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22(3-4): 239-311.
- **Sisler, H.D. 1986.** Control of fungal diseases by compounds acting as antipenetrants. *Crop Prot.* 5(5): 306-313.
- **Slomczynski, D., Nakas, J., Tanenbaum, W. 1995.** Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea*. *Appl. Env. Microbiol*. 61: 907-912.
- Smilanick, J.L., Hartsell, P.I., Henson, D., Fouse, D.C., Assemi, M. and Harris, C.M. 1990. Inhibitory activity of sulfur dioxide on the germination of spores of *Botrytis cinerea*. *Phytopathol*. 80: 217-220.
- Smith, R.H., 1992. Plant Tissue Culture-Techniques and Experiments. Academic Press.

- Smolinska, U., Morra, M.J. ,Knudsen, G.R. and Brown, P.D. 1997. Toxicity of glucosinolate degradation products from *Brassica napus* seed meal towards *Aphanomyces euteiches* f. sp. pisi. *Phytopathol*. 87: 77-82.
- **Snyder, B.A. and Nicholson, R.L. 1990.** Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site specific response to fungal ingress. *Science* 248: 1637-1639.
- Soares, A., Gracas, M., De Souza, P., De Souza, J., Abreu, C. and Pinto, J. 2003. Avaliação da actividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. *Cien. Agrotec*. *Lavras* 27: 259-254.
- **Soylu, S., Bennett, M. and Mansfield, J. 2002.** Induction of phytoalexin accumulation in broad bean (*Vicia faba* L.) cotyledons following treatments with biotic and abiotic elicitors. *Turk. J. Agric. For.* 26: 343-348.
- **Spadoro, D. and Gullino, M.L. 2005.** Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* 24: 601-613.
- **Stade, S. and Brambl, R. 1981.** Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: respiration and cytochrome c oxidase in *Neurospora crassa*. *Bacteriol*. 147(3): 757–767.
- **Stahl, D.J. and Schafer, W. 1992.** Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. *The Plant Cell* 4: 621-629.
- **Staples, R.C. and Mayer, A.M. 1995**. Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 134: 1-7.
- **Steel, C. and Nair, N. 1993.** The physiological basis of resistance to the dicarboximide fungicide iprodione in *Botrytis cinerea*. *Pest. Biochem. Physiol.* 47: 60-68.

- Stewart, A. 2001. Commercial biocontrol reality or fantasy. Aust. Plant Pathol. 30: 127-31.
- **Steward, R.R. and Bewley, J.D. 1980.** Liquid peroxidation associated with accelerate aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 65: 245-248.
- **Suárez, J. and Iñigo, B. 1990.** Microbial alterations in wines. Yeast and molds, En: Enological Microbiology. pp. 331–347. Mundi Prensa, Madrid.
- Sugiyama, M. 1999. Organogenesis in vitro. Curr. Op. Plant Biol. 2: 61–4.
- **Suhr, K. and Nielsen, P. 2003.** Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J. Appl. Microbiol.* 94: 665-674.
- **Swadling, I. and Jeffries, P. 1995.** Isolation of microbial antagonists for biocontrol of Grey Mould disease of strawberries. *Biocontrol Sci. Technol.* 6:125-136.
- **Sweigard, J.A., Chumley, F.G. and Valent, B. 1992.** Disruption of a *Magnaporthe grisea* cutinase gene. *Mol. Gen. Genet.* 232: 183-190.
- **Tahara, S. Ingham, J.L. Nakahara, S. Mizutani, J. and Harborne, J.B. 1984.** Fungitoxic dihydrofuranoisoflavones and related compounds in white lupin, *Lupinus albus*. *Phytochemistry* 23(9): 1889-1900.
- **Taiz, L. and Zeiger, E. 1998.** *Plant Physiology* (2<sup>nd</sup> ed.). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- **Takasugi, M., Katsui, N. and Shirata, A. 1986.** Isolation of three novel sulphur-containing phytoalexins from the chinese cabbage *Brassica campestris* L. ssp. pekinensis (Cruciferae). *J. Chem. Sot. Chem. Commun.* 14: 1077-1078.

- **Tal, B. and Robeson, D.J. 1986a**. The induction by fungal inoculation, of ayapin and scopoletin biosynthesis in *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* 25: 77-79.
- **Tal, B. and Robeson, D.J. 1986b.** The metabolism of sunflower phytoalexins. ayapin and scopoletin- plant-fungus interactions. *Plant Physiol.* 82: 167-172.
- **Tamogami, S., Mitani, M., Kodama, O. and Akatsuka, T. 1993**. Oryzalexin S structure: a new stemarane-type rice plant phytoalexins and its biogenesis. *Tetrahedron* 49: 2025-2032.
- **Tamura, H., Mizutani, A., Yukioka, H., Miki, N., Ohba, H. and Masuko, M. 1999.** Effect of the methoxuiminoacetamide fungicide, SSF129, on respiratory activity in *Botrytis cinerea*. *Pestic*. *Sci*. 55: 681-686.
- **Tanaka, Y., Data, E.S., Hirose, S., Taniguchi, T. and Uritani, I. 1983.** Biochemical changes in secondary metabolites in wounded and deteriorated cassava roots. *Agric. Biol. Chem.* 47: 693-700.
- **Ten Have, A. 2000.** The *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase gene family. Thesis (doctoral)-WageningenUniversiteit. ttp://library.wur.nl/wda/dissertations/dis2791.pdf.
- **Teutonico, R.Y. and Knorr, D. 1984.** Plant tissue culture: Food applications and the potential reduction of nutritional stress factors. *Food Technol.* 38: 120-127.
- **Tewari, S.N. 1990.** Toxic effect of few botanicals on three fungal pathogens of rice. En: Chari, M.S. and Ramprasad, G. (eds.). Proc. Symposium Botanical Pesticides in IPM, Neem Foundation, India. pp. 397–403.
- **Thevissen, K., Terras, F. R. and Broekaert, W. F. 1999.** Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5451-5458.

- **Theis, T., Wedde, M., Meyer, V. and Stahl, U. 2003.** The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(2): 588-593.
- Thomzik, J.E., Stenzel, K., Stocker, R., Schreier, P.H., Hain, R. and Stahl, D.J. 1997.

  Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51: 265-278.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.* 140:19-26.
- **Tiap-Ling, A. 2004.** Estudio químico bioguiado de los extractos con actividad analgésica y antinflamatoria de *Adesmia atacamensis* Phil. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Departamento de química farmacológica y toxicológica, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago-Chile.
- **Tomas-Barberan, F.A., Msonthi, J.D. and Hostettmann, K. 1988.** Antifungal epicular methylated flavonoids from *Helicrysum nitens*. *Phytochemistry* 27: 753-755.
- **Toral, M. 1983.** Estudio de la estructura, crecimiento y rendimiento en quillay (*Quillaja saponaria* Mol.). Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales. Departamento de Silvicultura y Manejo. Informe Técnico Final N° A 1180.8333. Santiago. Chile. 76p.
- **Toraland, M. y Rosende, R. 1986.** Producción y productividad de quillay. *Renares* 3 (8): 19-21.
- **Tripathi, P. and Dubey, N.K. 2004.** Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Post. Biol. Technol.* 32(3): 235-245.

- **Tschesche, R. and Lauven, I. 1971.** Avenacosid B, ein zweites bisdesmosidisches Steroidsaponin aus *Avena sativa. Chem. Ber.* 104: 3549-3555.
- **Tschesche, R., Tauscher, M., Fehlhaber, H.W. and Wulff, G. 1969.** Avenacosid A, ein bisdesmosidisches Steroidsaponin aus *Avena sativa*. *Chem. Eer.* 102: 2072-2082.
- **Tzortzakis, N.G. and Economakis, C.D. 2007.** Antifungal activity of lemongrass (*Cympopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innov. Food Sci. Emerging Technol.* 8(2): 253-258.
- **Ulrich1, J.T. and Mathre, D.E. 1972.** Mode of action of oxathiin systemic fungicides V. Effect on electron transport system of *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol*. 110(2): 628-632.
- United State Environmental Protection Agency. Consultado en Agosto de 2007.

  Regulating pesticides. www.epa.gov/pesticides/biopesticides.
- Urbano, M., Pérez-Juan, P., Luque de Castro, M.D. and. Gómez-Nieto, M. 2005. A fully automated method for in real time determination of laccase activity in wines. *Anal. Chim. Acta* 553: 99–104.
- **Uritani, I. and Hoshiya, I. 1953.** Phytopathological chemistry of the black-rotted sweet potato. Part 6. Isolation of coumarin substances from potato and their physiology. *J. Agric. Chem. Soc.* 27: 161-164.
- Van der Vlugt-Bergmans, C.J. and Wagemakers, C.A. and van Kan, J.A. 1997. Cloning and expression of e cutinasa A gene of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 10: 21-29.
- **VanEtten, H.D. and Bateman, D.F. 1971.** Studies on the mode of action of phaseollin. *Phytopathology* 61: 1363-1372.

- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A. and Farmer, E.E. 1994. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoanticipins. *Plant Cell* 6: 1191-1192.
- VanEtten, H.D. and Pueppke, S.G. 1976. Isoflavonoid phytoalexins. En: Friend, J. and Threlfall, D.R. (eds). Biochemical aspects of plant-parasite relationships. pp 239-289. Academic Press, New York.
- VanEtten, H.D., Sandrock, R.W., Wasmann, C.C., Soby, S.D., McCluskey, K. and Wang, P. 1995. Detoxification of phytoanticipins and phytoalexins by phytopathogenic fungi. Can. J. Bot. 73 (suppl. 1): S518–S525.
- Vanisree, M., Lee, C., Lo, S., Nalawade, S., Lin, C. and Tsay, H. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 1-22.
- Van Setten, D.C., ten Hove, G.J., Wiertz, E.J., Kamerling, J.P. and van de Werken, G. 1998. Multiple-stage tandem mass spectrometry for structural characterization of saponins. *Anal. Chem.* 70: 4401-9.
- Van Setten, D.C. and van de Werken, G. 1996. Molecular structures of saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Adv. Exp. Med. Biol.* 404: 185-93.
- Van Setten, D.C., van de Werken, G., Zomer, G. and Kersten, G.F. 1995. Glycosyl compositions and structural characteristics of the potential immuno-adjuvant active saponins in the *Quillaja saponaria* Molina extract quil A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9: 660-666.
- Van Setten, D.C., Zomer, G., van de Werken, G., Wiertz, E.J.H., Leeflang, B.R. and Kamerling, J.P. 2000. Ion trap multiple-stage tandem mass spectrometry as a pre-NMR tool in the structure elucidation of saponins. *Phytochem. Anal.* 11: 190-198.

- **Vega, A. y Prehn, D. 2005.** Inducción e inicio de maduración *in vitro* de tejido embriogénico de *Quillaja saponaria. Cien. Inv. Agr.* 32(3): 197-207.
- **Verhoeff, K. and Liem, J. 1975.** Toxicity of tomatine to *Botrytis cinerea*, in relation to latency. *Phytopathol. Zeitschrift* 82: 333-338.
- Veshkurova, O., Golubenko, Z., Pshenichnov, E., Arzanova, I., Uzbekov, V., Sultanova, E., Salikhov, S., Williams, H.J., Reibenspies, J.H. and Puckhaber, L.S. 2006.

  Malvone A, a phytoalexin found in *Malva sylvestris* (family Malvaceae).

  Phytochemistry 67(21): 2376-2379.
- Vidal, A., Fallarero, A., Silva de Andrade-Wartha, E.R., de Oliveira e Silva, A.M. de Lima, A., Pavan-Torres, R; Vuorela, P. and Mancini-Filho, J. 2006.
  Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja Bryothamnion triquetrum (S.G.Gmelin). Rev. Bras. Cienc. Farm. 42(4): 589-600.
- Villalobos, A.V., Loyola-Vargas, V.M., Robert, M.N. y Reyes, J. 1985. Obtención de productos secundarios a partir de cultivo de tejidos. En: Villalobos, A.V. (ed.). Fundamentos teóricos-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. 1-22 pp. Chapingo, México: CIEA.
- Villegas, I. 1999. Uso de los extractos de quillay como biopesticidas y estimulantes de crecimientos. Tesis de Ingeniero Civil, Facultad de Ingeniería Civil, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 134 p.
- **Visioli, F., Bellomo, G. and Galli, C. 1998**. Free-radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 60–64.

- **Vita, A. 1990.** Silvicultura en bosques esclerófilos y espinosos. En: Opciones silviculturales de los bosques esclerófilos y espinosos de la zona central de Chile. Apuntes Docentes Nº 3. Departamento de Silvicultura. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad de Chile. Santiago. Chile. pp. 75-92.
- Viterbo, A., Staples, R.C., Yagen, B. and Mayer, A.M. 1994. Selective mode of action of cucurbitacin in the inhibition of laccase formation in *Botrytis cinerea*.

  Phytochemistry 35: 1137-1142.
- Viterbo, A., Yagen, B. and Mayer, A.M. 1993. Cucurbitacins, attack enzymes and laccase in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 32: 61-65.
- Vsil, I.K. and Torpe, T.A. 1994. Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers. London.
- **Walden, R. and Wingender, R. 1995.** Gene-transfer and plant-regeneration techniques. *Trends Biotechnol.* 13: 324-31.
- Weidenborner, M., Hindorf, H. and Jha, H. C. 1990. Antifungal activity of flavonoids against storage fungi of the genus *Aspergillus*. *Phytochemistry* 29: 1103-1105.
- **Wharton, P. and Nicholson, R. 2000.** Temporal synthesis and radiolabelling of the sorghum 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins and the anthocyanin, cyanidin 3-dimalonyl glucoside. *New Phytol.* 145: 457-469.
- Wijnsma, R., Verpoorte, R., Mulder-Krieger, Th. and Baerheim-Svendsen, A. 1984.

  Anthraquinones in callus cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Phytochemistry* 23(10): 2307-2311.
- Wijnsma, R., Van Weerden, I.N. and Verpoorte, R. 1986. Anthraquinones in *Cinchona ledgeriana* bark infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Planta Med*. 52: 211-212.

- **Wiberg, S. 1991.** Factores que influyen en la germinación y producción de plantas de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.). Memoria para optar al título profesional de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile.
- **Windenradt, H.L. and Singleton, V.L. 1974.** The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 25: 119-126.
- **Wu, J. 1992.** Saponins adjuvants enhancement of antigenspecific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. *J. Immunol.* 148: 1519-1525.
- **Xu, J.R., Sweigard, J.A. and Hamer, J.E. 1997.** The CPKA gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressorial penetration. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 187-194.
- **Yoder, O.C. and Turgeon, B. G. 1996.** Molecular-genetic evaluation of fungal molecules for roles in pathogenesis to plants. *J. Genet.* 75: 425-440.
- **Yourman, L.F. and Jeffers, S.N. 1999.** Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 83: 569-575.
- Yu, H. and Sutton, J. 1997. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Can. J. Plant Path.* 19: 237-246.
- **Yu, H. and Sutton, J. 1999.** Density dynamic of *Gliocladium roseum* in relation to biological control of *Botrytis cinerea* in red raspberry. *Can. J. Plant Path.* 21: 23-32.
- Yukioka, H., Tanaka, R., Inagakis, S., Katoh, K., Miki, N., Mizutani, A., Masuko, M. and Kunoh, H. 1997. Mutants of the phytopathenic fungus *Magnaporthe grisea* deficient in alternative, cyanide-resistant, respiration. *Fung. Genet. Biol.* 22: 221-228.

- Yunis, H., Elad, Y. and Mahrer, Y. 1990. Effects of air temperature, relative humidity and canopy wetness on grey mould of cucumbers in unheated greenhouses. *Phytoparasitica* 18: 203-215.
- **Zamora, F. 2005.** El anhídrido sulfuroso, algunas reflexiones sobre este aditivo. *Revista Enólogos* Nº 38. En línea: http:://www.enologo.com/tecnicos/eno38/eno38.html
- **Zhang, P., Sutton, J. and Hopkins, A. 1994.** Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in container- grown black spruce seedlings. *Can. J. For. Res.* 24: 1312-1316.
- **Zhang, P., Sutton, J., Tan, W. and Hopkins, A. 1996.** *Gliocladium roseum* reduces physiological changes associated with infection of black spruce seedlings by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Plant Path.* 18: 7-13.
- **Zortzakis, N.G. and Economakis, C.D. 2007.** Antifungal activity of lemongrass (*Cympopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innov. Food Sci. Emerging Technol.* 8(2): 253-258.
- **Zuñiga, G. and Masardo, F. 1991.** Hydroxamic acid content in undifferentiated and differentiated tissues of wheat. *Phytochemistry* 30: 3281-3283.