

## Actividad de extractos alcohólicos de *Nardophyllum armatum* (Wedd.) Reiche (Asteraceae) de dos áreas geográficas de la Puna argentina sobre microorganismos fitopatógenos

D'Almeida, Romina E.<sup>1,4</sup>; Alberto, María R.<sup>1,3,4#</sup>; Zampini, Iris C.<sup>1,2,3,4</sup>; Ordoñez Roxana M.<sup>1,2,3,4</sup>; Isla, María I.<sup>1,2,3,4#</sup>

<sup>1</sup> INQUINOA (CONICET).

<sup>2</sup> Cátedra de Fitoquímica. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo Universidad Nacional de Tucumán.

<sup>4</sup> Fundación Miguel Lillo. Ayacucho 471. 4000- San Miguel de Tucumán. ARGENTINA.

# Ambos autores tuvieron el mismo grado de participación

# Autor para correspondencia: Dra. María Inés Isla. INQUINOA – CONICET, Cátedra de Química Orgánica y Biológica, Facultad de Ciencias Naturales e IML, Universidad Nacional de Tucumán. San Lorenzo 1469, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina. Fax: 54- 381-4248025, E-mail: misla@tucbbs.com.ar

► **Resumen** — D'Almeida, Romina E.; Alberto, María R.; Zampini, Iris C.; Ordoñez Roxana M.; Isla, María I. 2011. "Actividad de extractos alcohólicos de *Nardophyllum armatum* (Wedd.) Reiche (Asteraceae) de dos áreas geográficas de la Puna argentina sobre microorganismos fitopatógenos". *Lilloa* 48 (1). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antibacteriana y antifúngica de extractos de *Nardophyllum armatum* (Wedd.) Reiche (Asteraceae) de diferentes áreas geográficas de la Puna Argentina sobre microorganismos fitopatógenos de interés en la industria agrícola. Ambos extractos fueron eficientes para inhibir el crecimiento de hongos miceliales fitopatógenos tales como *Penicillium digitatum* y *Geotrichum candidum* por ensayos de macrodilución en agar. A 96 h de incubación el crecimiento de *G. candidum* fue inhibido en un 40 y 50% con 400 µg GAE.ml<sup>-1</sup> de los extractos de *N. armatum* LIL607928 e IEV91, respectivamente. Al mismo tiempo de incubación, la inhibición del crecimiento de *P. digitatum* fue de 60 y 20% con 1000 µg GAE.ml<sup>-1</sup> de los extractos LIL607928 e IEV91, respectivamente. La concentración inhibitoria mínima de los extractos sobre las bacterias fitopatógenas testeadas (*Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*) fue ≤ 400 µg GAE.ml<sup>-1</sup>. Los extractos de *N. armatum* mostraron mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de bacterias fitopatógenas que sobre hongos miceliales fitopatógenos. Los resultados obtenidos hasta el presente evidencian el potencial uso de extractos de *N. armatum* como una alternativa natural, no convencional y ecológicamente aceptable para la protección de los cultivos contra enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos.

**Palabras claves:** *Nardophyllum armatum*, bacterias fitopatógenas, hongos fitopatógenos, actividad antimicrobiana, Puna Argentina.

► **Abstract** — D'Almeida, Romina E.; Alberto, María R.; Zampini, Iris C.; Ordoñez Roxana M.; Isla, María I. 2011. "Activity of *Nardophyllum armatum* (Wedd.) Reiche (Asteraceae) alcoholic extracts from two different geographical areas of the Argentinian Puna against phytopathogenic microorganisms". *Lilloa* 48 (1). The aim of this study was to evaluate the antibacterial and antifungal capacity of *Nardophyllum armatum* (Wedd.) Reiche (Asteraceae) extracts from different geographical areas of the Argentinian Puna against pathogenic microorganisms of interesting in the agricultural industry. Both extracts showed antifungal activity against *Penicillium digitatum* and *Geotrichum candidum* by agar macrodilution assays. At 96 h of incubation, the radial growth inhibition of *G. candidum* was 40 and 50% with 400 µg GAE.ml<sup>-1</sup> of LIL607928 and IEV91 extracts, respectively. At the same incubation time, the radial growth inhibition of *P. digitatum* was 60 and 20% with 1000 µg GAE.ml<sup>-1</sup> of LIL607928 and IEV91 extracts, respectively. The minimum inhibitory concentration of the

plant extracts against the tested pathogenic bacteria (*Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*) was  $\leq 400 \mu\text{g GAE.ml}^{-1}$ . The *N. armatum* extracts showed higher growth inhibitory effect against bacterial phytopathogens than fungi phytopathogens. The results obtained shown the potential use of *N. armatum* extracts as a natural, non conventional method and environmentally acceptable for crop protection against diseases caused by microorganisms.

**Keywords:** *Nardophyllum armatum*, bacterial phytopathogens, fungi phytopathogens, antimicrobial activity, Argentinian Puna.

## INTRODUCCIÓN

La flora argentina es importante por su gran biodiversidad y constituye una rica fuente de plantas medicinales, aromáticas y alimenticias. Desde la antigüedad las plantas se utilizaron como alimentos, como recursos terapéuticos para combatir o prevenir enfermedades que afectaban a la población, como insecticidas, acaricidas, aleloquímicos, entre otros. Dichos usos derivan de la presencia en los vegetales de una amplia variedad de fitocompuestos, que hacen de las plantas una fuente de nuevas moléculas (Avalos-García y Pérez-Urria Carril, 2009).

### ESPECIES VEGETALES DE LA PUNA ARGENTINA COMO POTENCIAL FUENTE DE BIOACTIVOS NATURALES

La Puna es un ecosistema único de América del Sur que se despliega sobre el territorio de unos pocos países: norte de Chile, parte de Bolivia, sur de Perú y noroeste de Argentina. En la Argentina se extiende sobre el noroeste de Jujuy, parte de Salta, Catamarca, La Rioja y San Juan. Presenta condiciones extremas de temperatura, clima extremadamente árido, con nieve y granizo en invierno y escasas precipitaciones durante el año, baja presión atmosférica y alta exposición a radiación ultravioleta (R-UV) (Cabrera, 1953, 1976; Cabrera y Willink, 1980; Vilá, 2007). Las especies vegetales dominantes incluyen las familias Asteraceae, Poaceae, Fabaceae, Solanaceae y Verbenaceae (Cabrera, 1957, 1971, 1978; Bonaventura *et al.*, 1995; Malvárez, 1999; Borgnia *et al.*, 2006; Pérez, 2006; Cuello, 2006). Estas especies han sido usadas tradicionalmente por los habitantes de la Puna como plantas medicinales, alimenticias, material de construc-

ción, ornamentación, combustible y para actividades espirituales (Toursarkissian, 1980; Villagrán y Castro, 2000; Villagrán *et al.*, 2003; Pérez, 2006). Las especies vegetales que habitan estos ecosistemas de altura desarrollan una serie de estrategias para poder sobrevivir frente a las situaciones de estrés biótico y abiótico generadas. Entre ellas, sintetizan una enorme diversidad de metabolitos secundarios entre los que se destacan los compuestos polifenólicos, antocianinas, carotenoides, entre otros (Shirley, 1996; Rothschild y Mancinelli, 2001; Verpoorte y Memelink, 2002).

En trabajos previos se realizó un relevamiento de especies vegetales que crecen en la Puna Argentina (Tucumán, Catamarca, Salta y Jujuy). Se prepararon diferentes extractos y se evaluaron sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, citotóxicas y genotóxicas. Se observó que determinados extractos de especies vegetales de la Puna Argentina y algunos compuestos puros presentes en ellos tienen efecto antimicrobiano sobre patógenos humanos multiresistentes a antibióticos y sobre fitopatógenos de interés regional. También se observó efecto antioxidante, captador de radicales libres y especies reactivas de oxígeno ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y efecto antiinflamatorio mediante la inhibición de enzimas implicadas en numerosas patologías (Isla *et al.*, 2002, Ordoñez *et al.*, 2003, 2004, 2006; Zampini *et al.*, 2005, 2007, 2008, 2009; Sayago *et al.*, 2006; Kovacevich, 2009; Kovacevich *et al.*, 2009; Alberto *et al.*, 2009, Cuello *et al.*, 2011).

Extractos alcohólicos y acuosos de *Nardophyllum armatum* (Wedd.) Reiche (Asteraceae, nombre vulgar suri-yanta) (Fig. 1), recolectados a 4200 metros sobre el nivel del mar (msnm), presentan mayor contenido en



Figura 1. Partes aéreas de *Nardophyllum armatum*.

compuestos fenólicos totales y flavonoides que los obtenidos a partir de muestras recolectadas a 3650 msnm (D'Almeida *et al.*, 2007). En todos los extractos, se detectaron saponinas y terpenoides, pero no alcaloides. Además ambos extractos alcohólicos y acuosos presentan propiedades antioxidante y antibacteriana frente a bacterias patógenas humanas antibiótico-resistentes (D'Almeida *et al.*, 2007). Esta especie, originalmente descrita por Weddell (1856) como *Dolichogyne armata* Wedd., está ampliamente distribuida en la Puna del Noroeste Argentino extendiéndose por Bolivia y Chile (Bonifacino, 2008). En medicina popular es utilizada para el tratamiento de resfríos, como anti-tusivo, febrífugo, para el alivio del dolor de estómago e indigestión y como depurador de sangre en licores o mates (Alonso y Desmarchelie, 2005).

#### PRODUCTOS NATURALES EN EL CONTROL DE MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS

Las enfermedades vegetales causadas por microorganismos tales como bacterias y hongos tienen gran impacto en la productividad de los cultivos, incrementan costos ya que se

debe invertir en agroquímicos sintéticos cuyo uso indiscriminado ha llevado además a enfermedades e intoxicaciones en animales y en el hombre (Agrios, 1997). De allí la importancia de encontrar productos naturales para controlar enfermedades bacterianas y fúngicas en frutos y tubérculos comestibles (Rice *et al.*, 1998).

En trabajos previos se observó que productos naturales tales como proteínas (Isla *et al.*, 2002, Ordoñez *et al.*, 2006) y metabolitos secundarios, aislados de frutos y partes aéreas de plantas que crecen en el Noroeste Argentino (NOA) y productos derivados de ellas son potenciales agentes biocidas frente a microorganismos fitopatógenos de interés regional (Ordoñez *et al.*, 2004; Sayago *et al.*, 2006; Kovacevich *et al.*, 2009; Ordoñez *et al.*, 2011). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antibacteriana y antifúngica de extractos de *Nardophyllum armatum* recolectadas en diferentes áreas geográficas de la Puna argentina sobre microorganismos fitopatógenos y así contribuir al conocimiento de los potenciales usos de esta especie en agroindustria.

MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS  
SELECCIONADOS

*Erwinia carotovora* produce la desintegración de los tejidos (podredumbre blanda) y necrosis vascular de los órganos infectados (Bradbury, 1986). No se le conoce especificidad por un huésped en particular y se encuentra ampliamente distribuida en el país (Byrne *et al.*, 2005; Eriksson *et al.*, 1998).

*Agrobacterium tumefaciens* produce una enfermedad conocida como «agalla en corona» debido a que causa crecimiento de tumores en los tejidos de los vegetales atacados por transmisión de material genético al huésped (Hooykaas y Beijersbergen, 1994).

*Pseudomonas syringae* es un patógeno vegetal que puede infectar un amplio rango de especies de plantas, existiendo más de 50 diferentes patovares (raza de bacteria o grupo de razas con características iguales o similares, que están diferenciadas a nivel infraespecífico de otras razas de la misma especie o subespecie sobre la base de patogenicidad distintiva a uno o más hospedantes en plantas) (Iacobellis *et al.*, 1994).

*Xanthomonas campestris* produce una pudrición negra (necrosis) en las hojas de los vegetales que infecta (cebolla, coliflor, repollo) (Chan y Goodwin, 1999).

Entre los hongos causantes de enfermedad post-cosecha de citrus se pueden citar: *Penicillium digitatum* causantes de la podredumbre verde y *Geotrichum candidum* productor de podredumbre amarga en frutos de

limón (Hershenhorn, 1989; Droby, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Los ejemplares de *Nardophyllum armatum* (Wedd.) Reiche fueron recolectados en Febrero de 2006 en Aguas Calientes, Jujuy a 3650 msnm (IEV91) y en Antofagasta de la Sierra, Catamarca a 4200 msnm (LIL 607928) Argentina. Las muestras se depositaron en el herbario del «Instituto Miguel Lillo», Fundación Miguel Lillo (LIL), Tucumán, Argentina y en el Instituto de Estudios Vegetales (IEV), Tucumán, Argentina. La identificación botánica de las plantas fue realizada por la Licenciada Soledad Cuello.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Partes aéreas de al menos cinco individuos sanos y recolectados en el mismo ambiente geográfico y bajo las mismas condiciones se mezclaron. Se prepararon de la misma manera tres lotes. Cada lote de material vegetal fue secado a 40 °C en estufa durante un periodo de 5 días hasta peso constante y luego fue reducido a polvo con un molinillo a cuchillas. A partir de este material se prepararon tinturas (extractos alcohólicos) utilizando la metodología descrita en Farmacopea Argentina (1978) (Tabla1). A 5 g del material vegetal seco y triturado se le adicionaron 100 ml de etanol 80° y se maceraron durante 7 días a temperatu-

**Tabla 1.** Diseño experimental que contempla lote de individuos, extractos, contenido de compuestos fenólicos y determinación de la actividad antibacteriana.

Región	Lotes de 5 individuos c/u	Extractos (E) x lote (L)	Compuestos Fenólicos (CF)	Actividad antimicrobiana (AA)
Aguas Calientes (Jujuy)	L1	EL1	CFEL1	AAEL1
	L2	EL2	CFEL2	AAEL2
	L3	EL3	CFEL3	AAEL3
Antofagasta de la Sierra (Catamarca)	L4	EL4	CFEL4	AAEL4
	L5	EL5	CFEL5	AAEL5
	L6	EL6	CFEL6	AAEL6

ra ambiente. Cada uno de los extractos obtenidos se filtraron a través de papel de filtro (Whatman N° 4) y se conservaron a 4°C hasta su utilización.

#### PERFIL FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Los resultados fueron expresados en equivalentes de ácido gálico (GAE).

#### MICROORGANISMOS

Las especies de bacterias fitopatógenas ensayadas fueron obtenidas de la Colección de Cultivos Tipo (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, Burjasot, Valencia, España).

*Erwinia carotovora* var *carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris* pvar *vesicatoria* y *Pseudomonas syringae* pvar. *syringae*. Los cultivos fueron conservados a -20°C en medio cerebro corazón infusión conteniendo glicerol 20% y agar 1,5%.

Hongos fitopatógenos filamentosos: *Geotrichum candidum* Link Fr., cepa cedida por la Cátedra de Micología de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT y *Penicillium digitatum* (Pers.Fr) Sacc., cepa cedida por el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT. Los cultivos fueron conservados a 4 °C en Agar Sabouraud Glucosado y reactivados periódicamente.

#### OBTENCIÓN DE ESPORAS DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS

Las esporas de *P. digitatum* y *G. candidum* fueron obtenidas a partir de cultivos en medio Agar Sabouraud Glucosado a 30 °C durante 7 días. Sobre el cultivo se agregaron 10 ml de solución fisiológica estéril conteniendo 0,1% de Tween 80. La suspensión se colocó en un erlenmeyer conteniendo perlas de vidrio, se homogeneizó por agitación durante 10 minutos y posteriormente se filtró a través de gasa estéril. Los conidios fueron

obtenidos por centrifugación del filtrado a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, luego se lavaron y conservaron en agua destilada estéril hasta su uso. El recuento de conidios se realizó en cámara de Neubauer.

#### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Los cultivos de bacterias se resuspendieron en solución fisiológica y las suspensiones se ajustaron a la concentración de  $4 \times 10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup>. Para los hongos filamentosos el inóculo consistió en una suspensión de  $4 \times 10^4$  conidios.ml<sup>-1</sup>.

#### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La actividad antibacteriana de los extractos se evaluó mediante el método descrito en la CLSI, 2006 (Clinical Laboratory Standards Institute). La actividad antifúngica de los extractos se evaluó por el método descrito por Zacchino *et al.* (2007). La actividad de los extractos etanólicos se ensayó en concentraciones de 400 a 1000 µg.ml<sup>-1</sup> de compuestos fenólicos (GAE).

Se agregaron 0,5 ml de las diluciones del extracto en estudio a cajas de Petri de 5 cm de diámetro conteniendo 4,5 ml de medio Mueller Hinton Agar para bacterias y Agar Sabouraud Glucosado para hongos. Posteriormente, se inocularon con la suspensión de cada microorganismo (2 µl para bacterias y levaduras y 10 µl para hongos filamentosos).

Los cultivos bacterianos se incubaron durante 24 hs a 37°C. Los hongos filamentosos se incubaron durante 96 hs a 30 °C. Se realizaron los correspondientes controles de crecimiento microbiano (medio de cultivo + microorganismo), controles de solvente (medio de cultivo + 10% de etanol 80° + microorganismos) y controles positivos (medio de cultivo + clotrimazol 1 mg.ml<sup>-1</sup> + microorganismo).

Se evaluó la actividad antimicrobiana determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM), definida como la concentración más baja de extracto en equivalentes de compuestos fenólicos capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos.

La medición del crecimiento de los hongos filamentosos se realizó periódicamente determinando el crecimiento radial del micelio.

El porcentaje de inhibición de crecimiento radial de los hongos filamentosos (P) se calculó mediante la fórmula:  $P = [(C-T)/C] \times 100$ , donde C es el crecimiento micelial del hongo en el medio de cultivo sin extracto incorporado y T es el crecimiento micelial del hongo en el medio de cultivo con extracto incorporado (Nidiry y Badu, 2005).

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron por triplicado (3 réplicas x 3 extractos x 2 áreas geográficas) y se determinó la media y la desviación estándar. Todos los resultados se analizaron mediante el Student t-test. Valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados significativos.

#### RESULTADOS

Los extractos hidroalcohólicos de partes aéreas de *Nardophyllum armatum* recolectados de Jujuy y Catamarca a más de 3000 msnm presentan un contenido de compuestos fenólicos de  $1131 \pm 111$  y  $2246 \pm 200 \mu\text{g GAE.ml}^{-1}$ , respectivamente.

La Tabla 2 muestra el efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre el crecimiento radial de dos especies de hongos filamentosos responsables de enfermedades post-cosecha de limón. Los extractos preparados con muestras de las dos regiones, por separado, inhibieron el crecimiento de *P. digitatum* y *G. candidum*. *G. candidum* presentó una inhibición del crecimiento a las 96 h de incubación del 40 % con  $400 \mu\text{g GAE.ml}^{-1}$  de extracto de muestras de *N. armatum* recolectadas en Antofagasta de la Sierra, aumentando progresivamente este porcentaje hasta el 57% con  $800 \mu\text{g GAE.ml}^{-1}$ . Los extractos de partes aéreas de *N. armatum* recolectadas en Jujuy mostraron un efecto inhibitorio del

**Tabla 2.** Porcentaje de crecimiento radial de los hongos filamentosos por extractos alcohólicos de muestras de *N. armatum* recolectadas en dos regiones de la Puna Argentina. Los resultados son la media de tres determinaciones con tres extractos preparados con tres lotes de individuos. E1,2,3: extractos preparados con el lote 1, 2 y 3, respectivamente y E4,5,6: extractos preparados con el lote 4, 5 y 6, respectivamente. DS  $\pm$  5%.

<i>N. armatum</i>	$\mu\text{g GAE.ml}^{-1}$	<i>Penicillium digitatum</i>			<i>Geotrichum candidum</i>		
		24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h
E1,2,3	400	0	0	100	0	22	50
(Jujuy)	600	0	0	100	0	24	50
	800	0	0	100	0	24	50
	1000	0	0	80	0	19	56
E4,5,6	400	25	60	100	59	54	60
(Catamarca)	600	0	36	100	0	46	36
	800	0	0	80	0	10	43
	1000	0	0	40	0	4	43

**Tabla 3.** Concentración inhibitoria mínima de extractos alcohólicos de *N. armatum* obtenidos con individuos recolectados en dos regiones de la Puna Argentina sobre bacterias fitopatógenas. Los resultados fueron similares en todas las repeticiones independientemente del lote de individuos con el que se prepararon los extractos y del nivel altitudinal del que fueron recolectados.

Microorganismos	CIM $\mu\text{g GAE.ml}^{-1}$ <i>N. armatum</i>	
	Muestras recolectadas en Jujuy	Muestras recolectadas en Catamarca
<i>Erwinia carotovora</i>	$\leq 400$	$\leq 400$
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	$\leq 400$	$\leq 400$
<i>Xanthomonas campestris</i>	$\leq 400$	$\leq 400$
<i>Pseudomonas syringae</i>	$\leq 400$	$\leq 400$

crecimiento de *G. candidum* del 50% desde la mínima concentración ensayada.

Las extracciones realizadas con muestras de las especies recolectadas a dos niveles altitudinales producen un retardo en el crecimiento de *P. digitatum* hasta las 48 h dependiente de la dosis ensayada (respuesta dosis-dependiente). Si bien a las 96 h de incubación el crecimiento de *P. digitatum* se reactiva observándose un desarrollo micelial semejante al control para las menores concentraciones ensayadas de ambos extractos, el crecimiento fúngico disminuye 20 y 60% con 1000  $\mu\text{g GAE.ml}^{-1}$  de los extractos de Jujuy y Catamarca, respectivamente.

El valor de CIM de los extractos hidroalcohólicos de muestras de *N. armatum* obtenidas en las dos regiones en estudio sobre todas las bacterias fitopatógenas ensayadas fue  $\leq 400 \mu\text{g GAE.ml}^{-1}$  (Tabla 3).

#### DISCUSIÓN

El análisis de las partes aéreas de *N. armatum* reveló que las muestras recolectadas a mayor altitud presentan mayor contenido de compuestos fenólicos totales. Se observó una correlación positiva entre esta variable y la actividad antifúngica de las muestras recolectadas en Catamarca.

Todos los extractos preparados a partir de *N. armatum* tienen mayor efecto inhibi-

dor del crecimiento de *G. candidum* que sobre *P. digitatum*, ambos fitopatógenos de frutos cítricos.

Además se observó que presentan efecto inhibitor del crecimiento de bacterias fitopatógenas a concentraciones de compuestos fenólicos más bajas que las necesarias para inhibir o retardar el crecimiento de los hongos miceliales. Debido a la naturaleza química de los componentes de la pared celular, es de esperar que el efecto de los extractos sea mayor en bacterias que en hongos miceliales.

En trabajos previos demostramos que estos extractos también son activos sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas patógenas humanas antibiótico resistentes y que los responsables de este efecto serían compuestos de naturaleza fenólica (D'Almeida *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos hasta el presente evidencian la potencialidad del uso de extractos de *N. armatum* (rico en metabolitos secundarios polifenólicos) como una estrategia natural, no convencional y ecológicamente aceptable para la protección de los cultivos contra enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos. Sin embargo son necesarios estudios toxicológicos (fitotoxicidad y genotoxicidad) *in vitro* e *in vivo* para proponer un uso seguro de los mismos y realizar ensayos del efecto de los fito-

extractos *in vivo* que demuestren la efectividad de su uso en campo o post-cosecha.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de la investigación al Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT), Argentina, Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Alberto, M. R.; Zampini, I. C. & Isla, M. I. 2009. Inhibition of cyclooxygenase activity by standardized hydroalcoholic extracts of four Asteraceae species from the Argentine Puna. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42 (9): 787-790.
- Agrios, G. N. (1997). *Control of plant diseases. Plant pathology 4<sup>th</sup> edition*. California. Academic Press, 201-216.
- Alonso, J. R. & Desmarchelier, C. (2005). Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Editorial LOLA. Buenos Aires. Argentina.
- Avalos-García, A. & Pérez-Urria Carril, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, 2 (3): 119-145.
- Bonaventura, S.; Tecchi, R. & Vignale, D. 1995. The vegetation of the Puna Belt at Laguna de Pozuelos Biosphere Reserve in Northwest Argentina. *Vegetation*, 119: 23-31.
- Bonifacino, J. M. 2008. Reinstatement of *Ocyroe* (Compositae: Astereae). *Brittonia*, 60 (3): 205-212.
- Borgnia, M.; Maggi, A.; Arriaga, M.; Aued, B.; Vilá, B. L. & Cassini, M. H. 2006. Caracterización de la vegetación en la Reserva de Biosfera Laguna Blanca (Catamarca, Argentina). *Asociación Argentina de Ecología. Ecología Austral*, 16: 29-45.
- Bradbury, J. F. 1986. *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB International Mycological Institute. Kew. UK. pp. 332.
- Byrne J. M.; Dianese A. C.; Ji P.; Campbell H. L.; Cuppels D. A. & Louws F. J. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biological Control*, 5 (32): 408-418.
- Cabrera, A. L. 1953. Esquema fitogeográfico de la República Argentina. *Revista del Museo de La Plata (Nueva Serie)*, Botánica 8: 87-168.
- Cabrera, A. L. 1957. La vegetación de la Puna Argentina. *Revista de Investigación Agrícola*, 4: 317-412.
- Cabrera, A. L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 14: 1-42.
- Cabrera, A. L. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. *En: Kugler, W.F. (ed.)*, Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, II, A C M E.
- Cabrera, A. L. (1978). *Flora de la Provincia de Jujuy. Colección Científica del INTA*. Buenos Aires, Argentina. Parte X – Compositae.
- Cabrera A. L. & Willink A. 1980. *Biogeografía de América Latina*. 2a edición. Monografía 13. Serie de Biología. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington DC. EE.UU.
- Chan, J. W. Y. F. & Goodwin, P. H. 1999. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Advances*, 17 (6): 489-508.
- CLSI. 2006. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Seventh Edition document*, M7-A7.
- Cuello, S. 2006. *Guía ilustrada de la Flora de Antofagasta de la Sierra, Catamarca (Puna meridional Argentina)*. Tesina final de grado. Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Biblioteca FCN e IML Seminario No. 481.
- Cuello, S.; Alberto, M. R.; Zampini, I. C.; Ordoñez, R. M. & Isla, M. I. 2011. Comparative study of antioxidant and anti-inflammatory activities and genotoxicity of alcoholic and aqueous extracts of four *Fabiana* species that growth in mountainous area of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 512-522.
- D'Almeida, R.; Zampini, I. C. & Isla, M. I. 2007. Phytochemical and biological study of *Nardophyllum armatum* Wedd. extracts. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 5 (6): 242-243.
- Droby, S.; Cohen, L.; Rafael, G.; Wisniewski, M. & Macarisin, D. 2009. The biochemical basis of pathogenicity and host-specificity of *Penicillium digitatum* on citrus. VI International Postharvest Symposium, ISHS. *Acta Horticulturae Proceedings*, 877: 1572-1582.
- Eriksson, A. R. B.; Andersson, R. A.; Pirhonen, M. & Tapio Palva, E. 1998. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11 (8): 743-752.
- Farmacopea Argentina Codex Medicamentarius Argentino. 1978. 6a ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Codex S.A.
- Hershenhorn, J.; Bher, L.; Barash, I. & Arzee, T. 1989. Mode of sour rot formation as inferred from comparative studies with virulent and avirulent strains of *Geotrichum candidum*. *Journal of Phytopathology*, 126 (3): 257-271.



- Hooykaas, P. J. J. & Beijersbergen, A. G. M. 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. Annual Review of Phytopathology, 32: 157-181.
- Iacobellis, N. S.; Lavermicoccaa, P.; Grgurinab, I.; Simmacob, M. & Balliob, A. 1994. Phytotoxic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins. Physiological and Molecular Plant Pathology, 40 (2): 107-116.
- Isla, M. I.; Ordoñez, R. M.; Nieva Moreno, M. I.; Sampietro, A. R. & Vattuone, M. A. 2002. Inhibition of hydrolytic enzyme activities and plant pathogen growth by invertase inhibitors. Journal of Enzyme Inhibition, 17 (1): 37-43.
- Kovacevich, L.; Ordoñez, R.; Sayago, J.; Isla, M. I. 2009. Potencial aplicación de productos naturales en el control de la infección post-cosecha de frutas cítricas. XXII Jornadas Científicas. Asociación de Biología de Tucumán. Tafí del Valle, Tucumán. Argentina.
- Kovacevich, L. 2009. Uso de productos naturales para el control de patógenos de citrus. Tesina de Licenciatura. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.
- Malvárez, A. I. 1999. Tópicos sobre humedales subtropicales y templados de Sudamérica Oficina regional de Ciencia y tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe.
- Nidiry, E. S. J. & Babu, C. S. B. 2005. Antifungal activity of tuberose absolute and some of its constituents. Phytotherapy Research, 19: 447-449.
- Ordoñez, A. A.; Cudmani, N. M.; Gomez, D.; Vattuone, M. A. & Isla, M. I. 2003. Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq) Swartz. Microbiology Ecology in Health and Disease, 15 (1): 33-39.
- Ordoñez, R.; Nieva Moreno, M. I.; Vattuone, M. & Isla, M. I. 2004. Amaicha del Valle propolis: Isolation of chemical compounds with antimicrobial activity against phytopathogenic bacteria. Biocell, 28 (1): 154.
- Ordoñez, R. M.; Ordoñez, A. A. L.; Nieva Moreno, M. I.; Sayago, J. E. & Isla, M. I. (2006). Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt fruits. Peptides, 27 (3): 1187-1191.
- Ordóñez, R.; Zampini, I. C.; Nieva Moreno, M. I.; Isla, M. I. 2011. Potential application of Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. Microbiological Research, 166: 578-584.
- Perez, E. 2006. Las plantas utilizadas por la comunidad de Antofagasta de la Sierra, puna catamarqueña, Argentina. Tesina final de grado. Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Biblioteca FCN e IML Seminario N° 490.
- Rice, M. J.; Legg, M. & Powell, K. A. 1998. Natural products in agriculture. A view from the industry. Pesticide Science, 52: 184-188.
- Rothschild, L. J. & Mancinelli, R. 2001. Life in extreme environments. Nature, 409: 1092-1101.
- Sayago, J. E.; Negrillo Kovacevich, L.; Ordóñez, R. & Isla, M. I. 2006. Application of natural products on postharvest disease of citric fruits. Biocell, 30 (1) 147.
- Shirley, B. W. 1996. Flavonoid biosynthesis: new functions for an old pathway. Trends in Plant Science, 1 (11): 377-382.
- Singleton, V.; Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299: 152-178.
- Toursarkissian, M. 1980. Plantas medicinales de la Argentina. Editorial Hemisferio Sur, S.A., Buenos Aires, Argentina.
- Verpoorte, R. & Memelink, J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. Current Opinion in Biotechnology, 13: 181-187.
- Vilá, B. & Barros, C. 2007. Ambiente y sociedad en la Puna argentina. Los puneños y sus camélidos. Territorio, ambiente y sociedad. <http://www.educ.ar>.
- Villagrán, C. & Castro, V. 2000. Ciencia indígena de los Andes de Chile. Editorial Universitaria, pp. 244.
- Villagrán, C.; Romo, M. & Castro, V. 2003. Etnobotánica del sur de los andes de la primera región de Chile: un enlace entre las culturas altiplánicas y de las quebradas altas del Loa superior. Chungara Revista de Antropología Chilena, 35: 73-124.
- Weddell, H. A. (1856). Compositae: Dolichogyne. Chloris Andina, 1: 180-183.
- Zacchino, S. & Gupta, M. 2007. Manual de técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos. 1ª Ed. Corpus Editorial y Distribuidora.
- Zampini, I. C.; Vattuone, M. & Isla, M. I. 2005. Antibacterial activity against antibiotic-resistant Gram negative human pathogenic bacteria of hydroxychalcone isolated from *Zuccagnia punctata* Cav. Journal of Ethnopharmacology, 102: 450-456.
- Zampini, I. C.; Vera, N.; Bardón, A. & Isla, M. I. 2007. Antioxidant potential of *Baccharis incarum*: isolation of bioactive metabolites. Molecular Medicinal Chemistry, 11: 56-57.
- Zampini, I. C.; Meson Gana, J.; Ordoñez, R. M.; Sayago, J. E.; Nieva Moreno, M. I. & Isla, M. I. 2008. Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of plant species from the Argentine Puna (Antofagasta, Catamarca). Vol 21. Recent Progress in Medicinal Plants. India: Studium Press LLC, U.S.A. pp 95-110.
- Zampini, I. C.; Cuello, S.; Alberto, M. R.; Ordoñez, R. M.; D' Almeida, R.; Solorzano, E. & Isla, M. I. (2009) Antimicrobial activity of selected plant species from «the Argentine Puna» against sensitive and multi-resistant bacteria. Journal of Ethnopharmacology, 124: 499-505.