

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**ESTUDIO IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DOS
PROPOLEOS FRENTE A BACTERIAS FITOPATOGENAS**

por

Augusto Carlos ZIGNAGO PAULOS

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2011**

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. Msc. Pablo González

Ing. Agr. Msc. Vivienne Gepp

Dr. Ing. Agr. Pedro Mondino

Fecha:

Autor:

Augusto Carlos Zignago Paulos

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y a Julia por el invaluable y constante apoyo que me brindaron para lograr este objetivo.

A la Ing. Agr. Elisa Silvera Pérez por su incondicional apoyo en la elaboración de esta tesis.

A los integrantes del tribunal, Ing. Agr. Msc. Vivienne Gepp, Dr. Ing. Agr. Pedro Mondino y Ing. Agr. Msc. Pablo González por su tiempo, dedicación y aportes en la realización de esta tesis.

Al Ing. Agr. Oscar Bentancur por su colaboración en el análisis estadístico de los datos obtenidos.

Al los Ing. Agrs. Enrique Verdier, Pablo Cracco, Sebastián Segredo, Fernanda Zaccari y Bach. Química Shirley Furtado por su colaboración.

A todos mis amigos y compañeros.

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN..... | II |
| AGRADECIMIENTOS..... | III |
| LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES..... | VI |
| 1. <u>INTRODUCCIÓN</u> | 1 |
| 2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> | 2 |
| 2.1 BACTERIAS..... | 2 |
| 2.2 ENFERMEDADES CAUSADAS POR BACTERIAS A ESTUDIARSE EN EL PRESENTE TRABAJO..... | 3 |
| 2.3 CONTROL QUÍMICO..... | 8 |
| 2.3.1 <u>Antibióticos</u> | 8 |
| 2.3.2 <u>Cobre</u> | 9 |
| 2.3.3 <u>Resistencia a antibióticos y cobre</u> | 10 |
| 2.3.4 <u>Otros problemas que ocasionan el uso de cobre</u> | 11 |
| 2.3.5 <u>Discusión sobre la utilización de antibióticos en la agricultura</u> | 12 |
| 2.4 TENDENCIA MUNDIAL A PRÁCTICAS SUSTENTABLES..... | 13 |
| 2.5 PROPÓLEO..... | 14 |
| 2.5.1 <u>Definición</u> | 14 |
| 2.5.2 <u>Propiedades biológicas</u> | 15 |
| 2.5.3 <u>Mecanismo y espectro de acción</u> | 16 |
| 2.5.4 <u>Composición química y orígenes</u> | 16 |
| 2.5.5 <u>Extractos de propóleos</u> | 17 |
| 2.5.6 <u>Estudios de propóleos en fitopatología</u> | 18 |
| 3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> | 20 |
| 3.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO..... | 20 |
| 3.2 ORIGENES DE LOS PROPÓLEOS..... | 20 |
| 3.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS..... | 20 |
| 3.4 ENSAYO 1..... | 21 |
| 3.4.1 <u>Bacterias</u> | 21 |
| 3.4.2 <u>Preparación del inóculo</u> | 22 |
| 3.4.3 <u>Antibiograma</u> | 22 |
| 3.4.4 <u>Análisis estadístico</u> | 23 |
| 3.5 ENSAYO 2..... | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.5.1 | <u>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y su efecto bactericida de los extractos de propóleos sobre 15 aislamientos de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i></u> | 24 |
| 4. | <u>RESULTADOS</u> | 27 |
| 4.1 | ENSAYO 1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE PROPÓLEOS SOBRE LAS 10 BACTERIAS FITOPATOGENAS..... | 27 |
| 4.2 | DETERMINACIÓN DE LA CMI Y SU EFECTO BACTERICIDA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEOS SOBRE <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | 32 |
| 5. | <u>DISCUSIÓN</u> | 35 |
| 5.1 | ANTIBIOGRAMA..... | 35 |
| 5.2 | CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y SU EFECTO BACTERICIDA..... | 36 |
| 6. | <u>CONCLUSIONES</u> | 38 |
| 7. | <u>RESUMEN</u> | 39 |
| 8. | <u>SUMMARY</u> | 40 |
| 9. | <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 41 |
| 10. | <u>ANEXOS</u> | 55 |

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

| Cuadro No. | Página |
|---|--------|
| 1. Reportes de bacterias resistentes a antibióticos y/o cobre..... | 11 |
| 2. Bacterias fitopatógenas utilizadas en el experimento..... | 21 |
| 3. Preparación de medio NAD con extracto de propóleo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)..... | 25 |
| 4. Diámetro de inhibición producido por los extractos de propóleos de Canelones y Rocha sobre 10 bacterias fitopatógenas (medido en milímetros, media de 4 repeticiones)..... | 27 |
| 5. Concentración mínima inhibitoria y su efecto bactericida de los extractos de propóleos frente a aislamientos de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | 33 |
| Figura No. | |
| 1. Preparación del Antibiograma. Placa de Petri con discos de antibiograma impregnados con los tratamientos (1 minuto de secado)..... | 23 |
| 2. Inhibición producida por los extractos etanólicos de propóleos y el testigo (Disco No. 5) sobre <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | 28 |
| 3. Diámetro de inhibición medio producido por los EEP de los dos orígenes sobre las bacterias afectadas (promedio de las tres concentraciones)..... | 30 |
| 4. Correlación entre la concentración del extracto etanólico de propóleo y el diámetro de inhibición..... | 31 |

1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias constituyen el tercer grupo en importancia entre los patógenos de las plantas, existiendo 100 especies agrupadas en ocho géneros que producen daños tanto en campo como durante la poscosecha, causando grandes pérdidas económicas al agricultor.

Actualmente el control químico de enfermedades bacterianas depende principalmente de aplicaciones de fungicidas a base cobre y antibióticos. Debido al uso indiscriminado de estos productos ha surgido resistencia de las bacterias a los mismos, lo que ha hecho necesario el estudio de medidas de control alternativas.

El propóleo es un producto natural extraído por las abejas de diversas plantas. Es utilizado en defensa de la colmena contra microorganismos debido a su propiedad antimicrobiana. En los últimos 50 años las investigaciones científicas sobre propóleo se han incrementado. Sus propiedades biológicas han permitido su uso en medicina humana, y veterinaria, así como en el manejo de enfermedades de plantas. Existen en el Uruguay antecedentes en la investigación, sobre “El propóleo como alternativa al control químico en hortalizas”, Proyecto CSIC realizado en el año 2005-2006. En dicho estudio se evaluó el efecto de extractos de propóleos en el control de los patógenos *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* y *Fusarium sambucinum*. Ambos patógenos resultaron inhibidos, y el extracto etanólico fue el que presentó mayor acción.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar “in vitro” dos extractos de propóleo de distinto origen en la inhibición del crecimiento de *Pectobacterium carotovora* subsp. *atroseptica* (Pca), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Agrobacterium tumefaciens* (At), *Ralstonia solanacearum* (Rs), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Pseudomonas corrugata* (Pc), *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Xcc), *Pseudomonas savastanoi* subsp. *savastanoi* (Pss), *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcci).

2 REVISIÓN BIBLOGRÁFICA

2.1 BACTERIAS

Las bacterias son organismos microscópicos sumamente pequeños (0,2 a 1,2 μm de diámetro y 0,4 a 1,4 μm de longitud). Se conocen alrededor de 100 especies que producen enfermedades en plantas. Son organismos saprofitos facultativos y pueden cultivarse artificialmente en medios nutritivos, sin embargo las bacterias vasculares fastidiosas son difíciles de hacerlas crecer en medios de cultivo (Agrios, 2005).

Los principales géneros de bacterias fitopatógenas son: *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Streptomyces* y *Xyllela*. Nuevas técnicas de biología molecular han resultado en frecuentes propuestas de reclasificación de varios géneros y especies (Lopes y Quezado-Soares, 1997).

Este grupo lo constituye importantes patógenos de plantas por la gravedad de las enfermedades que causan en los cultivos, por la facilidad con que se diseminan y las dificultades encontradas en su control (Da Silva Romeiro, 2000).

Las bacterias, a diferencia de los hongos, no son capaces de penetrar directa y activamente a través de la superficie de las plantas. Lo hacen a través de heridas provocadas por rameado, insectos, nematodos o por el hombre en las prácticas culturales trasplante, poda, desbrote, cosecha y de aberturas naturales como estomas, hidatódos, lenticelas. Lluvias con viento favorecen la entrada principalmente de las bacterias que atacan la parte aérea (Lopes y Quezado-Soares, 1997).

Las enfermedades bacterianas ocurren en el campo y en la poscosecha, reducen la producción y afectan el producto para la comercialización, muchas veces causando pérdidas elevadas al productor. El alto contenido de agua de las hortalizas las convierte en plantas excepcionalmente sensibles al ataque de bacterias, patógenos altamente dependientes del agua para su infección, colonización y diseminación (Lopes y Quezado-Soares, 1997).

Las enfermedades bacterianas son muy difíciles de manejar. Algunas bacterias se pueden convertir en sistémicas en el tejido vascular de la planta por lo que es poco práctico erradicar el patógeno por medio de la poda de los tejidos sintomáticos o mediante la aplicación de un plaguicida a la superficie de la planta. Por otra parte, las bacterias experimentan un crecimiento exponencial,

lo que significa que sus poblaciones pueden duplicarse varias veces al día, dependiendo de la especie bacteriana y las condiciones ambientales, las enfermedades que causan llegan a ser explosivas (McManus y Stockwell, 2000).

Para el manejo de las enfermedades bacterianas con frecuencia se debe recurrir a una combinación de varios métodos de control para combatirlas: iniciar un cultivo con semillas o mudas sanas, rotación de cultivos, uso de variedades resistentes, un balance nutritivo equilibrado, riego, densidad de plantación, desinfección del suelo, y el uso de compuestos químicos (Lopes y Quezado-Soares 1997, Agrios 2005).

2.2 ENFERMEDADES CAUSADAS POR BACTERIAS A ESTUDIARSE EN EL PRESENTE TRABAJO

La agalla de la corona causada por *Agrobacterium tumefaciens*, tiene como sintomatología característica el tumor que suele aparecer en el cuello, raíz o en la parte aérea de la planta (López y Montesinos, 1996). Este género incluye aquellas bacterias que son habitantes de suelo y los patógenos formadores de agallas o tumores en las plantas (Montesinos y Beltrá, 1996). Las pérdidas económicas causadas por *Agrobacterium tumefaciens* son muy grandes en su conjunto, al haber sido citadas como posibles plantas huéspedes 643 especies y debido a que las plantas enfermas no deben ser comercializadas según la legislación fitosanitaria de numerosos países (López y Montesinos, 1996).

Reino: Procaryotae
División: Gracillicutes (Gram negativos)
Clase: Proteobacteria
Familia: Rhizobiaceae
Género: *Agrobacterium*
Especie: *tumefaciens* (Montesinos y Beltrá, 1996).

Dentro de las podredumbres blandas de la papa *Pectobacterium carotovora* subsp. *atroseptica* aparece como el agente causal del pie negro de la papa, estando asociada también en el síndrome de muerte temprana de las plantas de este cultivo (Powelson, 1985), ocasionando pudrición de semilla de papa o pierna negra de post-emergencia (Molina y Harrison, 1980). A nivel mundial se considera a *P. carotovora* subsp. *atroseptica* como uno de los principales problemas de la siembra de la papa por su frecuencia e incidencia

en los principales países productores de este cultivo (López y Montesinos, 1996).

Reino: Procaryotae
División: Gracillicutes (Gram negativos)
Clase: Proteobacteria
Familia: Enterobacteriaceae
Género: *Pectobacterium*
Especie: *carotovora*
Sub especie: *atroseptica* (Gardan et al., 2003).

El cancro cítrico, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Schaad, 2005) afecta a las especie de las Rutáceas, y dentro de ella a las especies de Cítricos (EPPO, 2005b), es la enfermedad cuarentenaria más importante de los cítricos (FAO, 2003). Los síntomas que ocasiona, tanto en hoja, fruto y ramas jóvenes se describen como lesiones necróticas, producidas por hipertrofia e hiperplasia, que se desarrolla hasta formar una costra. En hojas, la lesión suele comenzar por el envés y llega a poder observarse en ambas caras. En lesiones viejas el halo clorótico puede no aparecer, el centro puede cribarse y caer (Stall y Seymour 1983, EPPO 2005a). Causa pérdidas económicas directas por disminución en la cantidad y calidad de frutos. También es responsable de pérdidas económicas indirectas por limitar los mercados para la exportación (EPPO 2005b, CAB International 2005).

Reino: Procaryotae
División: Gracillicutes (Gram negativos)
Clase: Proteobacteria
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Xanthomonas*
Especie: *citri*
Sub especie: *citri* (Schaad, 2005)

La mancha foliar y podredumbre de poscosecha de las cucurbitáceas, es causada por *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*. Sus hospederos son las distintas especies de la Familia de las *Cucurbitaceas*, y dentro de ellos más específicamente los cultivos de zapallos, calabazas y pepino. La sintomatología que ocasiona en las hojas se reconoce por ser manchas angulares, amarillentas a grisáceas con borde acuoso y centro oscuro que puede caer o no, dando aspecto de cribado. En frutos las lesiones, pequeñas al principio, de color castañas y con halo oscuro, crecen en diámetro, se hunden, se agrietan formando canchales (Cassanello et al., 2006). Las pérdidas provocadas por esta

bacteria en años lluviosos podrían ser de gran importancia, alcanzando el 50% del descarte (González et al., 2002)

Reino: Procaryotae
División: Gracillicutes (Gram negativos)
Clase: Proteobacteria
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Xanthomonas*
Especie: *campestris*
Patovar: *cucurbitae* (Agrios, 2005).

La mancha bacteriana, ocasionada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Syn. *Xanthomonas vesicatoria* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, presenta como principales hospederos al cultivo de tomate y morrón entre otras solanáceas. La sintomatología que ocasiona en frutos de tomate se corresponde a manchas corchosas, de margen acuoso, de forma ovalada a irregular. Frutos de morrón raramente muestran síntomas. En hojas, tanto de tomate como de morrón, las lesiones aparecen en forma de manchas acuosas irregulares, primeramente verdes para luego volverse marrones o necróticas (EPPO, 2005c). En nuestro país la mancha bacteriana provoca importantes pérdidas de follaje y rendimientos sobre todo en tomate a campo (Maeso y Fernandez, 2010).

Reino: Procaryotae
División: Gracillicutes (Gram negativos)
Clase: Proteobacteria
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Xanthomonas*
Especie: *campestris*
Patovar: *vesicatoria* (Agrios, 2005).

La peca bacteriana es causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y como su nombre lo indica tiene como hospedero al cultivo de tomate. Ocasiona en hojas manchas punteadas, pardas bien delimitadas, angulosas con halo clorótico bien marcado, a veces confluentes. En flor y pedúnculo floral también da lugar a manchas pardas y en frutos pequeñas manchas circulares pardas similares a excrementos de mosca (Blancard, 1992).

Reino: Procaryotae
División: Gracillicutes (Gram negativos)
Clase: Proteobacteria

Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Pseudomonas*
Especie: *syringae* (Montesinos y Beltrá, 1996).
Patovar: *tomato*

La necrosis de la médula del tomate. Ha sido mencionada como una asociación de diferentes patógenos bacterianos, entre los que se incluyen *Pseudomonas corrugata* (Scarlett et al., citados por Nico et al., 2006). Los principales síntomas son la producción de raíces adventicias y coloración de castaño oscuro en los tallos. Al efectuar cortes longitudinales en los tallos se observan los síntomas típicos de necrosis medular: coloración castaño oscura y presencia de cavidades (Nico et al., 2006). Constituye una enfermedad de gran importancia económica y amplia difusión mundial (Scarlett et al., citados por Nico et al., 2006)

Reino: Procaryotae
División: Gracillicutes (Gram negativos)
Clase: Proteobacteria
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Pseudomonas*
Especie: *corrugata* (Montesinos y Beltrá, 1996).

La tuberculosis del olivo es causada por *Pseudomonas savastanoi* subsp. *savastanoi*, (Pérez-Martínez et al., 2008). Esta bacteria incita a la formación de agallas en plantas de olivo (*Olea europea*) y plantas ornamentales del tipo adelfas (*Nerium oleander*), los tumores se desarrollan en un inicio de forma aislada en las ramas de los árboles de Olivo, aunque también puede afectar al resto del vegetal: raíces, troncos, hojas y frutos (Penyalver et al., 2000).

Reino: Procaryotae
División: Gracillicutes (Gram negativos)
Clase: Proteobacteria
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Pseudomonas*
Especie: *savastanoi*
Subespecie: *savastanoi* (Pérez-Martínez, et al., 2008).

La marchera de la papa, es ocasionada por *Ralstonia solanacearum* anteriormente *Pseudomonas solanacearum* y más recientemente *Burkholderia*

solanacearum (Yabuuchi et al., 1995). Es un patógeno de gran importancia en las zonas tropicales y subtropicales, ya que afecta una gran diversidad de cultivos entre los que se incluyen solanáceas como el tomate (*Lycopersicon esculentum* L. Mill), berenjena (*Solanum melongena* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) así como también bananos (*Musa* spp.), maní (*Arachis hipogea* L.), plantas ornamentales como heliconias (*Heliconia* sp.), entre otros (Hernández et al., 2005). Los síntomas que ocasiona esta bacteria son típicamente de infección vascular, la planta se marchita y muere. Cuando las condiciones climáticas son favorables puede ocasionar pérdidas totales del cultivo. Esta bacteria logra sobrevivir en el suelo o infectando malezas por varios años (Agrios, 2005).

Reino: Procaryotae
División: Gracillicutes (Gram negativos)
Clase: Proteobacteria
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Ralstonia*
Especie: *solanacearum* (Agrios, 2005)

La bacteria fitopatógena causante del Cancro bacteriano, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* presenta como principal hospedero en importancia económica al cultivo de tomate, aunque ha sido reportado también para otras especies del género *Lycopersicum* spp., y en plantas silvestres como *Solanum douglasii*, *S. nigrum* y *S. triflorum*. Semillas contaminadas suelen dar lugar a las plantas aparentemente sanas, los síntomas aparecen sólo cuando las plantas llegan a estado reproductivo. Los primeros síntomas son la desecación del borde de los folíolos principalmente en hojas inferiores. En una etapa avanzada, pequeñas pústulas blanquecinas aparecen en las venas de la hoja y pecíolos, en los tallos y pecíolos pueden aparecer rayas marrones que se rajan y mostrar síntomas de canchales. Desde el primer reporte de esta enfermedad en los Estados Unidos en 1910, se ha extendido en todo el mundo y provoca graves pérdidas en cultivos de tomate tanto en los invernaderos como en campo. En Carolina del Norte (Estados Unidos), se han registrado una reducción del 70% en el rendimiento en algunos años (EPPO, 2005a).

Reino: Procaryotae
División: Firmicutes (Gram positivos)
Clase: Thallobacteria
Género: *Clavibacter*
Especie: *michiganensis*
Sub especie: *michiganensis* (Agrios, 2005)

2.3 CONTROL QUÍMICO

Los pesticidas químicos se utilizan actualmente tanto para la protección de plantas de las infecciones, como para erradicar a un patógeno que ya ha infectado a la planta (Agrios, 2005).

El control de enfermedades ocasionadas por bacterias ha sido en la historia, mucho más dificultoso y menos exitoso que el control de enfermedades fúngicas (Agrios, 2005). Productos a base de cobre y antibióticos registrados para uso agrícola no siempre resultan en un control eficiente de las bacteriosis que afectan los cultivos (Lopes y Quezado-Soares 1997, Lopes 2000). Fungicidas como los ditiocarbamatos (Conlin y Mccarter 1983, Lecigne et al. 2000) y el sulfato de zinc (Adaskaveg y Hine 1985, Pagani y Silvera 1998) son también utilizados para el control de las bacteriosis. La mezcla de cobre y mancozeb (Ditiocarbamato) es más efectiva que la utilización de cobre por si solo en el control de bacteriosis observándose un efecto sinérgico (Cook y Stall 1982, Marco y Stall 1983).

También se utilizan fumigantes para el control de bacteriosis de suelo (Lopes, 2000).

2.3.1 Antibióticos

Los antibióticos se han utilizado desde la década de 1950 para controlar ciertas enfermedades bacterianas en frutales, vegetales y plantas ornamentales (McManus et al., 2002).

Hoy en día, los antibióticos más comúnmente utilizados en el control de bacteriosis de las plantas son la estreptomina, oxitetraciclina y kasugamicina.

Estreptomina, es un antibiótico producido por la bacteria de suelo, *Streptomyces griseus*, de amplio espectro y de acción bactericida. En los Estados Unidos, el 60% se utiliza para el control de *Erwinia amylovora* en manzano y peral, siendo su uso en cultivos hortícolas insignificante (McManus y Stockwell, 2000). En Brasil, su uso está dirigido a aplicaciones en viveros de plantines, y tratamientos de boniato semilla (Lopes, 2000). Actualmente en el Uruguay no está registrado su uso (URUGUAY. MGAP. DGSSAA, 2010).

Oxitetraciclina, es producida por *Streptomyces spp.*, de acción bacteriostática (Lopes, 2000). En los Estados Unidos no se utiliza en cultivos hortícolas, solo es dirigido para el control de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* en duraznero y nectarino, y el control de *Erwinia amylovora* en manzano y peral

(McManus y Stockwell, 2000). Actualmente en el Uruguay no está registrado su uso (URUGUAY. MGAP. DGSSAA, 2010).

Kasugamicina, es producida por especies de *Streptomyces kasugaensis* y ha sido desarrollada para el control de la *Pyricularia oryzae* en el cultivo del arroz, teniendo también acción bactericida. Bacterias del género *Pseudomonas* spp. son fuertemente inhibidas (Lopes, 2000). Es utilizada en aplicaciones foliares y tratamiento de semillas, se ha desarrollado la resistencia tras su uso continuo pero esta decrece cuando cesan los tratamientos (Barberá, 1989). Actualmente en el Uruguay está registrado el sulfato de kasugamicina para el control de algunas bacteriosis (URUGUAY. MGAP. DGSSAA, 2010).

A diferencia de los fungicidas, los antibióticos presentan menor persistencia, necesiéndose aplicaciones más frecuentes (Lopes, 2000).

2.3.2 Cobre

Los productos cúpricos son productos ampliamente utilizados en la horticultura y fruticultura para el control de enfermedades fúngicas y bacterianas (Kimati, 1995). Existen formulaciones comerciales de cobre agrupadas en cuatro categorías: sulfatos, oxicluros, óxidos e hidróxidos (URUGUAY. MGAP. DGSSAA, 2010), encontrándose productos registrados para control de bacteriosis en cada una de ellas (Lopes y Quezado-Soares, 1997).

Cualquiera sea su formulación el cobre ocupa un importante papel entre los pesticidas inorgánicos. Su uso va desde tratamientos de semilla hasta aplicaciones invernales, pasando por múltiples usos en estado vegetativo sobre diversos cultivos pero con algunas limitaciones en cultivos susceptibles. La acción de los compuestos cúpricos es aun insustituible para el control de las bacteriosis (Barberá, 1989).

Poco se conoce acerca de la actividad del cobre como bactericida, mientras que el mismo producto por su acción fungicida ha recibido grandes atenciones (Horsfall, citado por Marco y Stall, 1983).

2.3.3 Resistencia a antibióticos y cobre

Uno de los principales problemas que presenta el uso de antibióticos y cobre para el control de las enfermedades bacterianas en las plantas es la pérdida de efectividad debido a la aparición de resistencia en las poblaciones de bacterias.

Cuando un producto es utilizado en forma comercial y se encuentra que ha perdido efectividad debido a que ha aparecido resistencia se habla de "resistencia adquirida". Resulta que la población del patógeno ya no es lo suficientemente sensible como para ser controlada. Este tipo de resistencia se conoció en primer lugar en bacterias patógenas humanas que se tornaron resistentes a los antibióticos y en los insectos resistentes al DDT (Mondino, 2001).

Esta problemática se encuentra ampliamente documentada en la bibliografía. Al principio de la década del 70 fue reportada la resistencia a Estreptomina en los EEUU. Este antibiótico era usado para el control del fuego bacteriano ocasionado por *Erwinia amylovora* (Coyier y Covey 1975, Beer y Norelli 1976). En la década del 80 también en los Estados Unidos, fueron evidenciados los primeros niveles de resistencia al cobre (Cooksey, 1990).

Se ha encontrado que bacterias resistentes al cobre fueron de forma simultánea resistentes a la estreptomina en varias especies como fueron *Pseudomonas cepacia*, *P. gladioli*, *P. syringae* pv. *actinidiae*, *Agrobacterium radiobacter* y *A. tumefaciens* (Goto et al., 1994).

En el cuadro No. 1 se mencionan algunas de las referencias sobre la detección de bacterias fitopatógenas resistentes a antibióticos y cobre.

Cuadro No. 1: Reportes de bacterias resistentes a antibióticos y/o cobre

| PATÓGENOS | PROD. QUÍMICOS | CULTIVO | AUTOR - Año | LUGAR |
|---|---|----------------|--|-------------------------|
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> | Cobre, Estreptomicina Cobre, Estreptomicina Cobre | Pimiento | Mirik et al. (2007) Ritchie y Dittapongpitch (1991) Marco y Stall (1983) | TURQUIA EEUU EEUU |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | Cobre, Estreptomicina | Varios | Scheck et al. (1996) | EEUU |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> | Cobre, Estreptomicina Cobre, Estreptomicina Cobre | Pimiento | Mirik et al. (2007) Ritchie y Dittapongpitch (1991) Marco y Stall (1983) | TURQUIA EEUU EEUU |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i> | Estreptomicina | Manzano | Jones et al. (1991) | EEUU |
| <i>Erwinia amylovora</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Xanthomonas</i> <i>Campestris</i> | Estreptomicina | Varios | McManus et al. (2002) | EEUU |
| <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Xanthomonas</i> spp. <i>Erwinia</i> spp. <i>Agrobacterium</i> spp. <i>Clavibacter</i> spp. <i>Curtobacterium</i> spp. | Cobre | Varios | Goto et al. (1994) | EEUU |
| <i>Xanthomonas</i> spp. | Cobre Estreptomicina Kasugamicina | Tomate | Montelongo et al. (2010) | URUGUAY |

2.3.4 Otros problemas que ocasionan el uso de cobre

Por otro lado debe tenerse en cuenta que el cobre es un metal pesado. Los metales pesados están considerados como muy peligrosos para los seres vivos en general, pues poseen una gran toxicidad, por su elevada tendencia a bioacumularse. Las continuas aplicaciones de productos cúpricos, producen la acumulación en los suelos de este metal, la extracción por parte de la planta es proporcional a la concentración en el medio, esto supone acumular este metal pesado para el siguiente nivel de la cadena trófica. Además el cobre es un fungicida y bacteriostático de amplio espectro, siendo un biocida para la mayor parte de los microorganismos (hongos y bacterias) que antagonizan, directa o

indirectamente, con los hongos y bacterias fitopatógenos en la superficie de las plantas y en el suelo favoreciendo a los patógenos resistentes (Labrador, citado por Cortés Rubira, 2010).

2.3.5 Discusión sobre la utilización de antibióticos en la agricultura

Existe una preocupación por parte de los consumidores por la seguridad alimentaria. La justificación para el uso de antibióticos en la producción de alimentos tanto de origen animal como en el sector hortifrutícola es ampliamente cuestionada. Varias organizaciones no gubernamentales reclaman por el abuso de antibióticos resultando en la aparición de bacterias patogénicas resistentes a antibióticos, contaminación del medio ambiente y de los alimentos (Allerberger et al., 2002).

Hay una falta general de conocimiento de la importancia del uso agrícola de los antimicrobianos como factor de resistencia, incluso entre los expertos en medicina y salud pública. El uso agrícola de los antibióticos es la principal causa de la resistencia en todo el mundo, por cuatro razones: la mayor cantidad de antibióticos es utilizada por la agricultura, la mayoría resulta en exposiciones sub-terapéuticas contra las bacterias, los mismos antibióticos son utilizados en agricultura y medicina humana, y la población humana esta expuesta a los patógenos resistentes a los antimicrobianos a través del consumo de alimentos, así como el contacto directo (Silbergeld et al., 2008).

Los seres humanos consumen únicamente la mitad de todos los antibióticos a nivel mundial. Casi la totalidad de lo que resta se añade al pienso animal para el tratamiento masivo de las enfermedades infecciosas o para fomentar el crecimiento. Los antimicrobianos se añaden asimismo al agua para el tratamiento de las enfermedades ictícolas y se pulverizan sobre cultivos alimentarios para el tratamiento de determinadas enfermedades como es el 'fuego bacteriano' del manzano (OMS, 2005).

Existen reportes de bacterias resistentes asociadas al hombre en la agricultura. Estudios realizados en agua y suelo agrícola informaron de la presencia de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos (terramicina, oxitetraciclina y gentamicina) y *Salmonella* resistentes a cobre (Lopez et al., 2009). También es amplia la investigación sobre la transferencia de bacterias resistentes de animales a los seres humanos a través de la transmisión por los alimentos (Piddock 1996, Blanco et al. 1997, Bolton et al. 1999, Swartz 2002). Otros autores encontraron que una fracción de genes de resistencia a la estreptomocina en las bacterias asociadas a las plantas fue similar a las encontradas en las bacterias aisladas de humanos, animales y del suelo. Sin

embargo el papel del uso de antibióticos en las plantas en la crisis de resistencia a los antibióticos en medicina humana es sujeto a debate (McManus et al., 2002).

Los antimicrobianos son utilizados en la horticultura y fruticultura, pero los riesgos de tales usos para la salud humana son menos conocidos (OMS, 2001). La comunidad médica de los EEUU afirma que el surgimiento de estirpes resistentes en patógenos humanos es debido al mal uso de antibióticos durante el tratamiento y no por el uso agrícola. Sin embargo existen pruebas de una significativa diseminación de ciertos géneros de bacterias resistentes (por ejemplo, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Enterococcus*) desde los animales a los seres humanos (OMS, 2005).

Por otro lado es reducido el número de antibióticos utilizados en el manejo de enfermedades de plantas, en comparación con los de uso en veterinaria. En los EEUU está registrada la estreptomina para su uso en el cultivo de manzano, peral, plantas ornamentales, tomate, pimiento y papa. Y la oxitetraciclina para duraznero y nectarino, peral y manzano. Siendo esto importante ya que las enfermedades bacterianas atacan a casi todos los cultivos, y no existen registros para ello (McManus, 2001). En Uruguay sucede algo semejante existiendo pocos antibióticos registrados y en apenas para algunos cultivos (URUGUAY. MGAP. DGSSAA, 2010).

No se espera la aparición de nuevos antibióticos que sean utilizados en la agricultura debido a los costos elevados de desarrollo, las limitaciones reglamentarias y las preocupaciones medioambientales y la salud humana. Alternativas a los antimicrobianos, como los agentes de control biológico, las plantas transgénicas y productos químicos nuevos, se están desarrollando y comercializando, aunque su eficacia está por determinar (Vidaver, 2002).

2.4 TENDENCIA MUNDIAL A PRÁCTICAS SUSTENTABLES

Durante los últimos años se ha incrementado la conciencia acerca de la necesidad de preservar los recursos naturales y el medio ambiente tanto para las generaciones actuales como las futuras. En este contexto, hoy en día los objetivos de la producción agrícola son el brindar a los consumidores productos de calidad e inocuidad asegurada, producidos mediante métodos conservacionistas de los recursos naturales, respetuosos con el medio ambiente (Mondino y Vero, 2006).

En relación a las frutas y hortalizas, el concepto de “calidad” ha sufrido una fuerte evolución de modo que ya no se refiere a la mera estética del producto (forma, tamaño, color) sino que incluye, aspectos relacionados al proceso de producción y comercialización. O sea la preservación de los recursos naturales durante su producción, la preservación del medio ambiente, el cuidado de la salud de los trabajadores y consumidores forman parte ahora, de ese nuevo concepto de calidad (Mondino y Vero, 2006).

Esta forma de producción queda enmarcada en el concepto de Producción Integrada, la cual se define como “la producción económica de frutas y hortalizas de alta calidad, dando prioridad a métodos ecológicamente más seguros, minimizando el uso de agroquímicos y sus efectos colaterales no deseados, poniendo énfasis en la protección del medio ambiente y la salud humana” (Avilla y Telis, 2003).

Uno de los objetivos de la Producción Integrada hace énfasis en la reducción del uso de productos de síntesis destinados a la protección de los cultivos y en este esquema el Control Biológico aparece como una herramienta indispensable al momento de diseñar y poner en práctica sistemas de manejo integrado (Mondino y Vero, 2006).

Este método de control puede definirse como toda forma de control que no involucra el uso de plaguicidas de síntesis química; incluyendo el uso de microorganismos antagonistas, uso de sustancias naturales o modificación de la resistencia del huésped (Wilson y Wisniewski, 1994).

El uso de propóleos para el control de enfermedades bacterianas en las plantas aparece entonces como una herramienta apropiada y factible de ser utilizada en sistemas de manejo integrado en la producción sustentable de frutas y hortalizas.

2.5 PROPÓLEO

2.5.1 Definición

El propóleo es un producto de composición compleja. Las abejas (*Apis mellifera*) lo obtienen por adición de cera y secreciones salivales al material resinoso, gomoso o balsámico que recolectan de yemas, brotes y heridas de diversas plantas (Ghisalberti, 1979). La palabra propolis es derivada del griego donde *pro* significa “en defensa de” y *polis* “ciudad”, esto es en defensa de la ciudad o de la colmena (Marcucci 1995, Burdock 1998).

Las abejas usan esta sustancia para protegerse contra insectos y microorganismos, empleándolo para el reparo de grietas o daños en la colmena, en la preparación de celdas asépticas para la postura de la abeja reina y la momificación de animales invasores. Se acostumbra encontrar en la colmena pequeños animales o parte de ellos envueltos en propóleo, en perfecto estado de conservación (Marcucci, 1995), debido a la acción antimicrobiana del propóleo, lo que impide la descomposición del cadáver (Park et al., 1998).

El propóleo está constituido por una gran variedad de compuestos químicos, su composición varía según la fuente de procedencia, se caracteriza por tener un 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% granos de polen (Grange y Davey 1990, Burdock 1998).

2.5.2 Propiedades biológicas

El propóleo ha sido objeto de estudios farmacológicos debido a sus propiedades antibacteriana (Gebara et al. 1996, Valcic et al. 1999, Stepanovic et al. 2003, Popova et al. 2005, Bankova 2005, Kosalec et al. 2005, Simões et al. 2008), antifúngica (Dobrowolski et al. 1991, Sawaya et al. 2002), antiviral (Amoros et al., 1994), antiinflamatoria (Khayyal et al., 1993), analgésica (De Campo et al., 1998), antioxidante (Özcan 2000, Kumazawa et al. 2004), anticancerígeno (Heo et al., 2001), inmunomoduladora (Ivanovska et al., 1995), antiulcerosas-cicatrizante (Kiderman et al., 2001) y anticariogénica (Ikeno et al. 1991, Koo 2000).

Una de las propiedades más importante del propóleo es su actividad antimicrobiana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides, el principal compuesto fenólico del propóleo (Asís 1989, Grange y Davey 1990, Brushi et al. 2003).

Los flavonoides son pigmentos vegetales, sintetizados a partir del aminoácido fenilalanina, que generalmente exhiben brillantes colores como el de los pétalos de las flores. La mayoría de las veces emiten fluorescencia cuando son excitados por la luz UV, y se localizan en las células de las plantas verdes. Los flavonoides son usados por los botánicos para clasificación taxonómica. Ellos regulan el crecimiento de las plantas e influyen en otras células biológicas de diversas maneras. Los flavonoides inhiben o destruyen muchas especies bacterianas, inhiben importantes enzimas virales, tales como la transcriptasa reversa y otras diversas proteasas, y además, destruyen algunos importantes protozoos (Havsteen, 2002).

2.5.3 Mecanismo y espectro de acción

El mecanismo de acción del propóleo es complejo y no se puede hacer una analogía con el modo de acción de los antibióticos clásicos (Takaisi-Kikuni y Schilcher, 1994).

Se ha reportado que la actividad antimicrobiana de un extracto de propóleo fue más activa que las fracciones obtenidas por partición con diferentes solventes, sugiriendo que la actividad antimicrobiana es probablemente causada por el efecto sinérgico de varios compuestos (Krol, citado por Marcucci 1996, Santos et al. 2002, Hayacibara 2004).

Los extractos de propóleo han sido evaluados sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas, encontrándose una mayor efectividad sobre las primeras (Akopyan et al. 1970, Grange y Davey 1990, Marcucci et al. 2001, Lu et al. 2005). El extracto de propóleo demostró actividad antibacteriana contra el 67,7 % de los aislados testados; el 92,6 % de los aislados gram positivos y el 42,5 % de los gram negativos fueron sensibles al extracto (Castagna de Vargas et al., 2004).

2.5.4 Composición química y orígenes

Propóleos de distintos orígenes fueron investigados por su acción antibacteriana, antifúngica y antiviral, se demostró que a pesar de tener la misma actividad hubieron diferencias en su composición química. En las zonas templadas, es sabido que son flavonoides y esteroides de ácidos fenólicos los responsables de mencionada actividad; en las zonas tropicales, los propóleos no contenían estas sustancias pero mostraron similar actividad. Obviamente diferentes muestras, con diferentes combinaciones de sustancias son esenciales para la actividad biológica del propóleo (Kujumgiev et al., 1999).

Por otro lado se investigó la actividad antibacteriana con extractos de propóleo de distinta procedencia del estado de Campeche, México, dando como resultado que existen diferencias según el origen fitogeográfico de cada propóleo (Tolosa y Cañizares, 2002).

La actividad antimicrobiana del propóleo de diferentes localidades en Turquía fue investigada y correlacionada con su composición química. Los principales componentes analizados fueron distintos según su ubicación geográfica y los extractos de propóleo mostraron diferentes efectos inhibitorios contra las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Proteus vulgaris* (Katircioglu y Mercan, 2006)

Se ha demostrado químicamente que los exudados de los árboles de tipo Alamo (*Populus alba*), son el principal recurso de propóleo de zonas con clima mediterráneo como la zona norte de Europa, Sudamérica, y oeste de Asia (China). Menos comúnmente, en otras partes del mundo, géneros como *Betula*, *Ulmus*, *Pinus*, *Quercus*, *Salix*, y *Acacia* son utilizadas como recurso para el propóleo (Greenaway et al., 1989).

También ha sido demostrado, que la composición química del género *Populus* incluye principalmente muchos tipos de flavonoides, flavonas y fenoles (Kumazawa et al. 2002, Popova et al. 2005).

Por otro lado, en China se identificaron también nuevos componentes, como son el: ácido ferúlico y ácido cafeico y sus ésteres (Marcucci y Bankova, 1999).

En países con clima tropical como Brasil los principales componentes de los propóleos son, terpenoides y prenilados, los cuales derivan de ácidos cumarínicos. Esta diferencia ha sido explicada por el diferente origen vegetal de este propóleo, el cual, pertenece principalmente al género *Baccharis* spp (Bohlman et al. 1981, Marcucci y Bankova 1999).

En Chile, en la región de ToroBayo, Valdivia, fueron aislados cinco flavonoides: galangina, crisina, pinocembrina, 3-metil galangina y 7 metil galangina. Casi todos ellos son característicos del género *Populus*, razón por la cual se estima que, en la recolección de propóleos, las abejas usan en proporción importante el exudado de las yemas de este género (Alarcón y Núñez, citados por Del Rio Martínez, 2006).

En Uruguay se identificaron 18 tipos de flavonoides, 4 ácidos aromáticos carboxilados y 11 ésteres de ácidos fenólicos. Dos de los flavonoides no estaban registrados en la literatura, pinobanksina y 2 metil-2-butenil ferulato. Los demás componentes fueron similares a los encontrados en Europa y China, por lo que se ha sugerido que el propóleos Uruguayo tiene el mismo origen vegetal que estas regiones (Kumazawa et al., 2002).

2.5.5 Extractos de propóleos

Para la extracción de las sustancias activas se utilizan diferentes solventes como son el etanol, metanol y agua.

El extracto de propóleo etanólico fue comparado con el extracto acuoso de propóleo en su actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. El extracto acuoso no inhibió el crecimiento bacteriano, en cambio el extracto etanólico lo hizo a partir de concentraciones mayores a 30% de etanol. Los extractos etanólicos de propóleos con una concentración de etanol entre 30% y 90% tienen actividad antibacteriana, mostrando su mayor actividad entre 60% y 80% de etanol (Park e Ikegaki, 1998b).

Con un análisis de cromatografía líquida de alta frecuencia (CLAE) en fase reversa, se verificó que la mayoría de los flavonoides identificados fueron extraídos en los porcentajes etanólico de 60 a 80%, coincidiendo estos últimos con la mayor actividad antibacteriana (Park et al., 1998a).

Se comparó la actividad antimicrobiana “in vitro” de extractos de propóleos con diferentes solventes, frente a *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* y *Fusarium sambucinum*. El extracto acuoso no presentó actividad, pero sí lo hicieron los extractos etanólicos (70%), metanólicos (70%) e hidroamoniacoal (6%). El extracto etanólico al 70% fue el que presentó mayor inhibición para los dos patógenos evaluados siendo esta diferencia significativa (González et al., 2007).

2.5.6 Estudios de propóleo en fitopatología

El efecto antifúngico de un extracto metanólico de propóleo fue evaluado *in vitro* contra *Phytophthora infestans*, *P.capsici* y *P. parasitica*. Las concentraciones 3, 5, 7 y 10 ug/ml inhibieron completamente el crecimiento micelial de las tres especies de *Phytophthora* (Yusuf et al., 2005).

En otro estudio se validó el potencial fungicida del propóleo contra *Phytophthora infestans* *in vivo*. Los mejores resultados en la reducción de severidad de tizón tardío, fueron obtenidos con extracto de propóleo al 0,3%, los cuales fueron equivalentes al tratamiento con el fungicida Metalaxyl (Barbosa-Medeiros et al., 2007).

Un componente del propóleo, el éster del ácido cafeico, fue sintetizado químicamente y evaluado *in vitro* e *in vivo* sobre el patógeno *Alternaria alternata* en tomate. Los resultados indican que este constituyente reduce el crecimiento micelial *in vitro* y ejerce mayor control que el fungicida Captan® *in vivo* sin efectos negativos en la maduración y calidad del tomate (Ojeda-Contreras et al., 2008).

Se validó el efecto del extracto etanólico de propóleo (EEP) en la incidencia y severidad de cercospora y roya del cafeto. El EEP disminuyó la incidencia y severidad de cercospora en mudas de cafeto y redujo la incidencia de roya en un cafetal en producción (Spaziani-Pereira et al., 2008).

Se estudió la actividad antifúngica del extracto metanólico de propóleo sobre *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporium* f.sp. *melonis*. El crecimiento micelial presentó inhibición en ambos hongos, sin embargo *Fusarium oxysporium* fue más sensible que *Alternaria alternata*, demostrando que el extracto de propóleo puede ser usado como antifúngico (Ozcan et al., 2004)

Fue evaluada la eficacia de un extracto etanólico de propóleo sobre *Colletotrichum lindemuthianum*, “in vitro”. Existió una reducción del crecimiento micelial con concentraciones de 6 a 10 % de extracto de propóleo, y la concentración de 30% tuvo un efecto fungicida (Obasa et al., 2007).

Fue evaluada la actividad antimicrobiana “in vitro” de extractos de propóleo, frente a *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* y *Fusarium sambucinum* aislados de un cultivo de zapallo. El extracto etanólico de propóleo presentó una inhibición significativa del crecimiento para los dos patógenos evaluados (González et al., 2007).

La actividad antibacteriana del extracto de propóleo fue investigada en Turquía sobre bacterias patógenas agrícolas y se encontró que *P. syringae* pv. *phaseolicola* fue la más sensible a una concentración de extracto de propóleo de 1/10 y la sensibilidad de las bacterias siguieron la secuencia *P. syringae* pv. *phaseolicola* > *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. corrugata*, *R. solanacearum* > *E. carotovora* pv. *carotovora*, *P. syringae* pv. *syringae*, *E. amylovora*, *A. tumefaciens*, *A. vitis*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Basim et al., 2006).

El efecto antibiótico del extracto acuoso de propóleo en varias concentraciones fue evaluado contra cinco bacterias fitopatógenas donde *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* fueron completamente inhibidas en medio de cultivo conteniendo 10% de extracto de propóleo. *Erwinia chrysanthemi* fue parcialmente inhibida, en cuanto *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* se mostró insensible al extracto de propóleo (Bianchini y Bedendo, 1998).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Fitopatología de Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

3.2 ORÍGENES DE LOS PROPÓLEOS

Los propóleos se obtuvieron de dos apiarios: uno situado en la zona de producciones intensivas de Canelones, del Centro Regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía, cercano a Progreso y el otro de una zona de producciones extensivas cercanas a Rocha, con el objetivo de tener materiales de diferente origen botánico. La recolección se realizó mediante rejilla de plástico (tipo mosquitero), permitiendo obtener un producto con menos impurezas.

3.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para cada propóleo se pesaron 120 gr. y se añadió en 1L de alcohol 70°, quedando a una concentración de 12%. Cada propóleo en alcohol se colocó en un matraz y se sometió a una temperatura de 70° C bajo agitación continua durante 30 minutos en un agitador marca Barnstead/Thermolyne modelo SP46920-26. Los extractos se colaron con un filtro de papel tipo Whatman 40, se colocaron en tubos Falcon de 12 ml y se centrifugaron en una centrifuga marca HERMLE modelo Z383K a 2500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se esterilizó mediante filtrado con membrana de nitrocelulosa 0,2 µc marca Minisart y se colocó en un vaso de bohemia de 50 ml estéril. Este procedimiento se realizó en asepsia dentro de la cámara de flujo laminar marca NUAIRE Laminar Flow Product modelo UN-201-430E. Cada extracto de propóleo original de 12% se diluyó al 8% y 4% con etanol 70°. Se dispuso en envases de vidrio estéril hermético y se almacenó a 4° C hasta su uso.

3.4 ENSAYO 1

3.4.1 Bacterias

Las bacterias utilizadas en el experimento provinieron de la Bacterioteca del Unidad de Fitopatología de Facultad de Agronomía (FA); Dirección General

de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (DGSSAA-MGAP) y del Departamento de Protección Vegetal de INIA “Las Brujas” (INIA-LB). Diez bacterias patógenas de cultivos hortícolas y frutícolas se utilizaron en el trabajo experimental (Cuadro No. 2).

Cuadro No. 2: Bacterias fitopatógenas utilizadas en el experimento.

| PATOGENOS | CULTIVO HOSPEDERO | ENFERMEDAD | ORIGEN |
|--|--------------------------|---------------------------|------------------------|
| <i>Pectobacterium carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> (Pca) | Papa | Pie Negro | Brasil DGSSAA-MGAP |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Xv) | Tomate | Mancha bacteriana | Uruguay FA |
| <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) | Tomate, Morrón | Cancro Bacteriano | Uruguay DGSSAA-MGAP |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (At) | Frutales: Rosáceas | Agalla de corona | Uruguay FA |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> (Rs) | Papa, Tomate | Marchitamiento bacteriano | Uruguay FA |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (Pst) | Tomate | Peca bacteriana | Uruguay FA |
| <i>Pseudomonas corrugata</i> (Pc) | Tomate | Tallo hueco | Uruguay FA |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i> (Xcc) | Cucurbitáceas | Bacteriosis | Uruguay FA |
| <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (Pss) | Olivo | Tuberculosis del olivo | Uruguay INIA-LB |
| <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> (Xcci) | Citrus | Cancro cítrico | Uruguay DGSSAA-MGAP |

3.4.2 Preparación del inóculo

Cada bacteria fue sembrada en el medio Nutriente Agar Dextrosado (NAD) (Ver Anexo No. 1) e incubada a 27°C durante 48 hs. en estufa de crecimiento marca Pablo Ferrando, modelo ES 64ST. Luego se tomaron 2 o 3 anzadas de cada una y se mezcló en 5 ml de saline, agitándolas en un Vortex marca Thermolyne Type, modelo 16700 Mixer para lograr una suspensión uniforme. Las concentraciones de cada una de las 10 bacterias se ajustaron a 0.1 de absorbancia (longitud de onda 550 nm) con un espectrofotómetro marca Jenway, modelo 6305 estimándose una concentración de 1×10^8 cel.ml⁻¹ (Da Silva Romeiro, 2001).

3.4.3 Antibiograma

El análisis de la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos se realizó mediante la técnica de antibiograma (Bauer et al., 1966). Diez mililitros de las suspensiones bacterianas fueron incorporadas a 30 ml de medio NAD (el cual se preparó concentrado para 40 ml) a una temperatura de 40° C y dispensadas en placas de Petri de 15 cm de diámetro, resultando una concentración de $2,5 \times 10^7$ cel.ml⁻¹. Discos de antibiograma de 12.7 mm de diámetro estériles fueron impregnados con los extractos de propóleos de Canelones y Rocha a las concentraciones 40, 80, 120 mg.ml⁻¹ y etanol 70° (testigo), secados por un minuto y colocados sobre cada placa, como se muestra en las figura No. 1. Las placas fueron incubadas a 27° C durante 48 hs. La variable medida fue el diámetro de inhibición en milímetros, y para esto se utilizó un Calibre Digital marca Mitutoyo Serie 500 (Japan), con una resolución de 0.01 mm.

La actividad antimicrobiana determinada mediante el antibiograma fue medida como el diámetro de inhibición en milímetros, donde el valor 12,7 mm corresponde al disco de papel utilizado con un valor de inhibición nulo.



Figura No. 1: Preparación del antibiograma. Placa de Petri con discos de antibiograma impregnados con los tratamientos (1 minuto de secado).

3.4.4 Análisis estadístico

El diseño experimental fue en bloques completos al azar con 7 tratamientos y 4 repeticiones. El arreglo fue Factorial donde se evaluó dos factores (órigenes: Canelones y Rocha), en 3 niveles (concentraciones: 120 – 80 – 40 mg.ml⁻¹). El modelo es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_{i\varphi} + \beta_k + \varepsilon_{i\varphi k}$$

El análisis estadístico se efectuó usando el paquete estadístico SAS versión 9.1.3 (SAS INSTITUTE, 2006). Se realizaron análisis de varianza, ajustando

modelos lineales generales donde se tomaron en cuenta el efecto del origen, dosis y su interacción, así como la presencia de un tratamiento testigo. Se realizaron análisis separados por bacteria. Las comparaciones entre los tratamientos se efectuaron usando el test de Tukey ($\alpha=0,05$).

3.5 ENSAYO 2

3.5.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y su efecto bactericida de los extractos de propóleos sobre 14 aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)

En base a los resultados del ensayo 1 en el cual el efecto inhibitorio fue mayor para Cmm se determinó la CMI, y el efecto bactericida de dicha concentración para esta bacteria.

Esto se realizó sobre 14 aislamientos de Cmm que fueron obtenidos de colección, siete correspondientes a la Unidad de Fitopatología de la Facultad de Agronomía (UDELAR), seis del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Las Brujas (INIA-LB) y una de la Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (DGSSAA-MGAP).

En tubos estériles se adicionaron NAD estéril (mantenido a 40 °C en baño maría) y los extractos etanólicos de propóleos y/o etanol 70° (testigo) en volúmenes variables para obtener diferentes diluciones finales (Cuadro No. 3). Las concentraciones utilizadas para la evaluación de la CMI fueron 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0,0625; 0,030; 0,0155; 0,008; 0,004 y 0,002. La concentración inicial de los extractos fue de 12% (Cuadro No. 3). El contenido de cada tubo (15 ml) se homogenizó y se vertió en una placa de Petri estéril. Se hicieron 3 repeticiones de cada concentración para cada aislamiento.

Cuadro No. 3: Preparación de medio NAD con extracto de propóleo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

| Tubo | Volumen de propóleo o etanol (ml) | Volumen de medio NAD (ml) | Proporción final del EEP (%) |
|------|-----------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 1 | 1.25 | 13.75 | 1 |
| 2 | 0.625 | 14.375 | 0.5 |
| 3 | 0.312 | 14.688 | 0.25 |
| 4 | 0.156 | 14.844 | 0.125 |
| 5 | 0.78 | 14.922 | 0.0625 |
| 6 | 0.387 | 14.961 | 0.031 |
| 7 | 0.12 | 14.98 | 0.0155 |
| 8 | 0.01 | 14.99 | 0.008 |
| 9 | 0.0050 | 14.995 | 0.004 |
| 10 | 0.0025 | 14.998 | 0.002 |

Por otro lado se prepararon en saline (0,85 % p/v de cloruro de sodio) las suspensiones de células bacterianas de los 14 aislamientos de Cmm a partir de colonias en fase de crecimiento exponencial (27°C, 48 hs). La concentración fue ajustada con un espectrofotómetro a 0,1 de absorbancia (550 nm), estimándose una concentración de 1×10^8 cel.ml⁻¹ (Da Silva Romeiro, 2001). De cada suspensión se tomó una alícuota de 5 µl y se sembró en placas preparadas con las diferentes diluciones de propóleos o alcohol. Placas sin propóleo y alcohol se sembraron como control de viabilidad. Luego, se incubaron invertidas a 27 ° C, durante 72 hs. La concentración mínima inhibitoria fue registrada como la mínima concentración de extracto de propóleo que inhibe el crecimiento bacteriano, mediante el método de diluciones seriadas en NAD. El desarrollo de una sola colonia en la zona de inóculo no se consideró positivo.

Se determinó el efecto bactericida de las CMI de cada propóleo sobre los 14 aislamientos de Cmm. En tubos ependorf se adicionó Nutriente Broth Dextrosado (NBD) (Anexo No. 1), y los extractos de propóleos a la concentración mínima inhibitoria de cada aislamiento. Los ependorf fueron sembrados con 10 µl de suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^8 cel.ml⁻¹ estimada con espectrofotómetro a 0.1 Abs. (550 nm) (Da Silva Romeiro, 2001), e incubados en agitación en un shaker marca ORBITAL Shaker

Multipurpose, modelo S2030-1000-230v a 140 rpm, con una temperatura de 27° C, durante 72 hs. Ependorf sin propóleo y alcohol se sembraron como control de viabilidad. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Transcurrido este tiempo 5 µl fueron colectados y sembrados en placas de Petri con NAD estéril. Las placas fueron incubadas a 27°C durante 72 hs. Se evaluó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano determinándose el efecto bactericida de las concentraciones.

La determinación de la CMI y su efecto bactericida se repitió una vez.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAYO 1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE PROPÓLEOS SOBRE LAS 10 BACTERIAS FITOPATÓGENAS

Solo cuatro de diez bacterias tuvieron alguna inhibición en el crecimiento. Dichas bacterias son *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Ralstonia solanacearum* (Rs), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) y *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Xcc) como se muestra en el cuadro No. 4.

Cuadro No. 4: Diámetro de inhibición producido por los extractos de propóleos de Canelones y Rocha sobre las 10 bacterias fitopatógenas (medido en milímetros, media de 4 repeticiones).

| Bacteria | PROPOLEO CANELONES | | | PROPOLEO ROCHA | | | Testigo (etanol 70°) |
|-------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | 120 mg.ml ⁻¹ | 80 mg.ml ⁻¹ | 40 mg.ml ⁻¹ | 120 mg.ml ⁻¹ | 80 mg.ml ⁻¹ | 40 mg.ml ⁻¹ | |
| Pca | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a |
| Xcv | 15,1 a | 13,3 b | 12,7 b | 12,8 b | 12,7 b | 12,7 b | 12,7 b |
| Cmm | 25,6 a | 25,2 ab | 23,8 bc | 22,5 cd | 22,6 cd | 21,1 d | 12,7 e |
| At | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a |
| Rs | 16,6 a | 14,7 b | 12,7 c | 15,0 ab | 13,4 bc | 12,7 c | 12,7 c |
| Pst | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a |
| Pc | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a |
| Xcc | 16,3 a | 14,5 b | 12,9 c | 13,2 bc | 13,4 bc | 12,7 c | 12,7 c |
| Xcci | 13,1 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a |
| Pss | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a | 12,7 a |

Las medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente por el test de Tukey ($\alpha=0.05$). Datos originales en Anexo No. 2.

Las bacterias *Pectobacterium carotovora* subsp. *atroseptica* (Pca), *Agrobacterium tumefaciens* (At), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *P. corrugata* (Pc), *P. sevastanoi* pv. *sevastanoi* (Pss) y *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcci), no fueron inhibidas por ninguno de los extractos de propóleos a las concentraciones evaluadas (Cuadro No. 4).

Los extractos etanólicos de propóleos (EEP) de los dos orígenes inhibieron con diferencias estadísticas significativas respecto al testigo, el crecimiento de Cmm en todas la concentraciones evaluadas (Cuadro No. 4 y Figura No. 2).

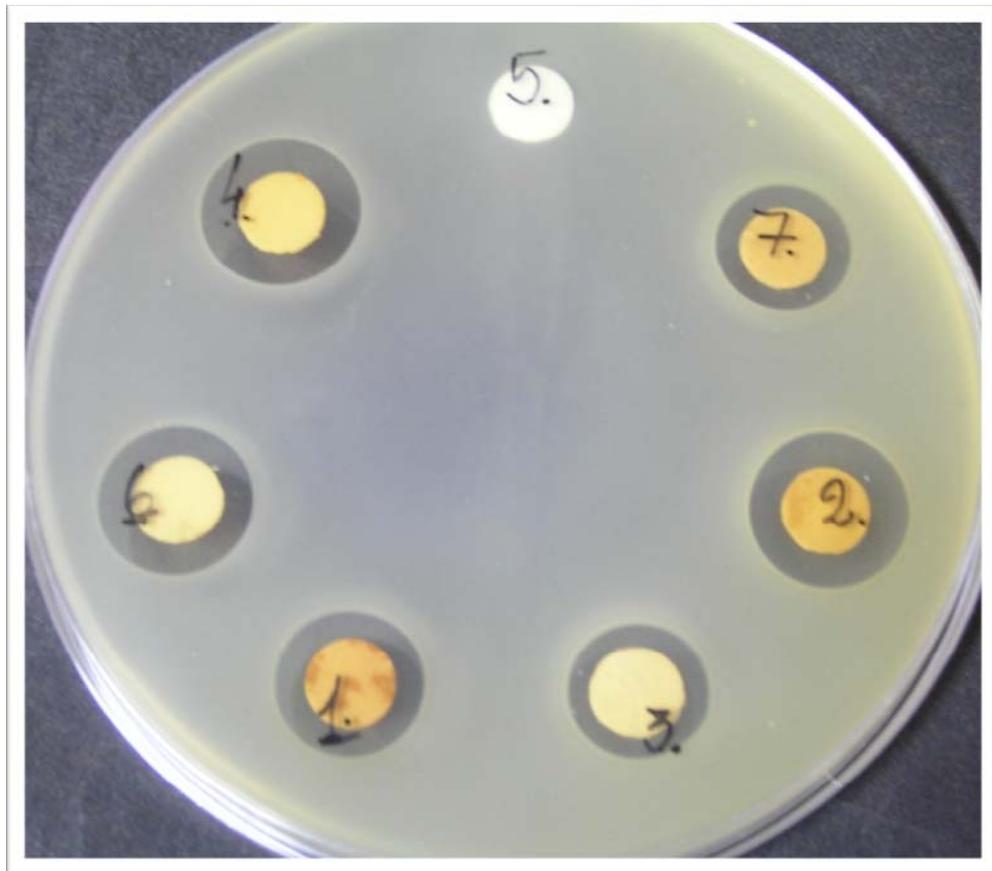


Figura No. 2: Inhibición producida por los extractos etanólicos de propóleos y el testigo (Disco No. 5) sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Ralstonia solanacearum resultó inhibida en las concentraciones 80 y 120 mg.ml⁻¹ del EEP de Canelones y 120 mg.ml⁻¹ del EEP de Rocha (Cuadro No. 4). Las restantes concentraciones no se diferenciaron del testigo.

Xanthomonas campestris pv. *cucurbitae* mostró inhibición en las concentraciones de 120 y 80 mg.ml⁻¹ del EEP de Canelones no siendo afectada por la menor concentración de el EEP Canelones (40 mg.ml⁻¹) ni por ninguna de las concentraciones del EEP de Rocha (Cuadro No. 4).

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* fue inhibida en la concentración de 120 mg.ml⁻¹ del EEP de Canelones (Cuadro No. 4). Las restantes concentraciones no se diferenciaron del testigo.

El EEP de Canelones inhibió con diferencias significativas a cuatro de las bacterias probadas: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* y *Ralstonia solanacearum*. En cambio el EEP de Rocha inhibió a solamente dos de ellas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Ralstonia solanacearum* (Cuadro No. 4).

Existió diferencia significativa en la inhibición de los extractos de propóleos de distintos orígenes. Al comparar por ejemplo la concentración de 120 mg.ml⁻¹ en *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *X. c.* pv. *cucurbitae*, así como se observó que los diámetros de inhibición en las tres concentraciones de EEP sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* son diferentes (Cuadro No. 4).

Por otro lado, considerando el diámetro de inhibición promedio de todas las bacterias afectadas se observa que el EEP de Canelones produjo mayor diámetro de inhibición que el de Rocha con diferencias significativas siendo las medias 16.9 y 15.4 mm respectivamente como se observa en la figura No. 3.

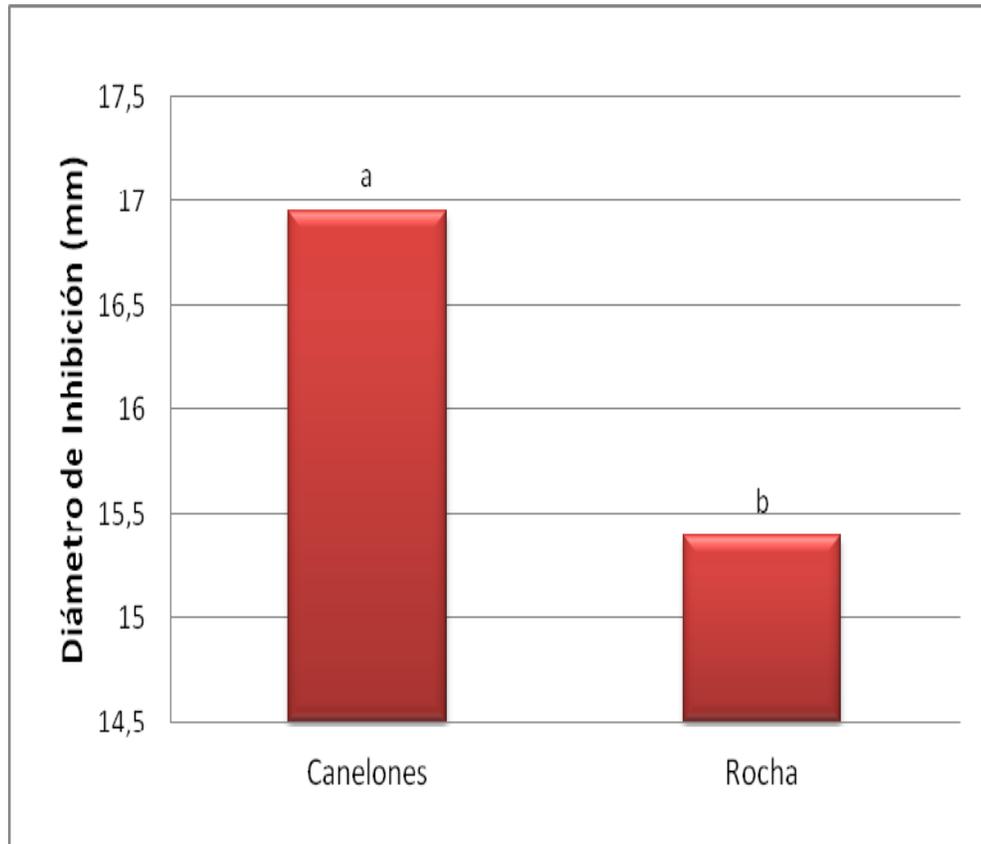


Figura No. 3: Diámetro de inhibición medio producido por los EEP de los dos orígenes sobre las bacterias afectadas (promedio de las tres concentraciones).

Considerando el efecto de las diferentes concentraciones de los EEP, existe una correlación positiva entre el diámetro de inhibición y la concentración, con un coeficiente de correlación (R^2) de 94 %. Es decir a mayor concentración de EEP, mayor el diámetro de inhibición logrado (Figura No. 4).

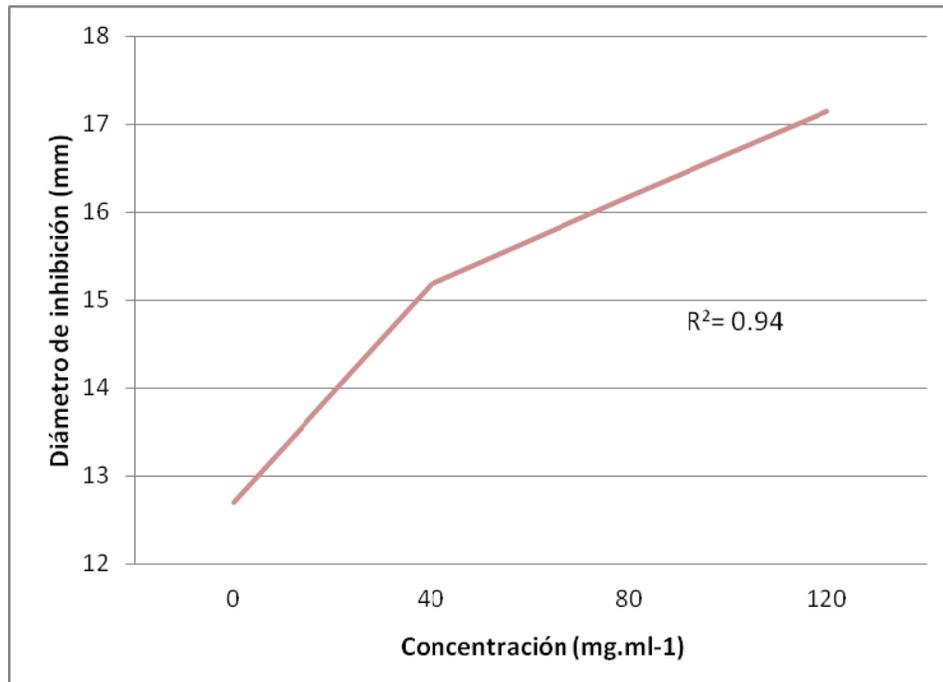


Figura No. 4: Correlación entre la concentración del extracto etanólico de propóleo y el diámetro de inhibición.

El testigo etanol 70°, solvente utilizado para la preparación de los extractos, no mostró ningún efecto inhibitorio frente a las bacterias evaluadas. Como se observa en la Cuadro No 3 y en la figura No 2 el testigo tiene un valor de diámetro de inhibición de 12,7 mm correspondiente al diámetro del disco de papel usado para el antibiograma (con inhibición nula).

4.2 DETERMINACIÓN DE LA CMI Y SU EFECTO BACTERICIDA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEOS SOBRE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)

Los 14 aislamientos de Cmm probados crecieron en las placas de control de viabilidad, por lo cual todas fueron consideradas en la determinación de la CMI.

Todos los aislamientos de Cmm se desarrollaron en las placas con etanol, a las concentraciones evaluadas. El etanol utilizado como solvente del propóleo, no inhibió el desarrollo bacteriano en las concentraciones evaluadas.

En el Cuadro No. 5 se presenta el efecto de las diferentes concentraciones de extracto de propóleo sobre el crecimiento de los aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* evaluados.

Todos los aislamientos fueron sensibles a los dos extractos etanólicos de propóleos. Los valores de CMI oscilaron entre 0,02 - 0,3 mg.ml⁻¹ para el EEP de Rocha y 0,04 – 0,3 mg.ml⁻¹ para EEP de Canelones (Cuadro No. 5). Los valores de CMI del extracto de propóleo de Rocha presentaron prácticamente igual rango que el propóleo de Canelones.

Los aislamientos de Cmm se comportaron diferentes frente a los extractos. El 50% de los aislamientos fue sensible al extracto de propóleo de Canelones a la concentración 0,3 mg.ml⁻¹. Mientras que para el EEP de Rocha, el 42,8% de los aislamientos fue sensible a la concentración de 0,04 mg.ml⁻¹ (Cuadro No. 5).

Cuadro No. 5: Concentración mínima inhibitoria y su efecto bactericida de los extractos de propóleos frente a aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

| Aislamientos | EEP Canelones (mg.ml-1) | | EEP Rocha (mg.ml-1) | |
|--------------|-------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| | CMI ¹ | EB ² | CMI ¹ | EB ² |
| DGSA | 0,155 | + | 0,04 | + |
| FAGRO 1 | 0,3 | + | 0,04 | + |
| FAGRO 2 | 0,3 | + | 0,08 | - |
| FAGRO 3 | 0,3 | + | 0,3 | - |
| FAGRO 4 | 0,155 | + | 0,04 | - |
| FAGRO 5 | 0,155 | + | 0,04 | - |
| FAGRO 6 | 0,04 | - | 0,02 | - |
| FAGRO 7 | 0,3 | + | 0,08 | + |
| INIA-LB 1 | 0,3 | + | 0,3 | + |
| INIA-LB 2 | 0,155 | + | 0,04 | - |
| INIA-LB 3 | 0,3 | - | 0,08 | - |
| INIA-LB 4 | 0,3 | - | 0,3 | - |
| INIA-LB 5 | 0,155 | + | 0,04 | - |
| INIA-LB 6 | 0,155 | + | 0,02 | - |

¹ - CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

² - EB: Efecto Bactericida de la CMI.

+ = Con efecto bactericida

- = Sin efecto bactericida

La CMI del extracto etanólico de propóleo de origen Canelones tuvieron efecto bactericida en un 78,5% de los casos. En cambio para el propóleo de origen Rocha la CMI resultó bactericida en un 28,5% de los aislamientos (Cuadro No. 5).

5 DISCUSIÓN

5.1 ANTIBIOGRAMA

Los EEP inhibieron el crecimiento bacteriano de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*. Existieron diferencias significativas en la capacidad antibacteriana de los propóleos de diferente origen (Canelones y Rocha).

La diferente actividad antibacteriana del propóleo proveniente de las dos zonas es explicada por la variación en la composición química de los propóleos dado por la diversidad de la flora de cada zona, como fue observado también por Kujumgiev et al. (1998), Tolosa y Cañizares (2002) en propóleos de diferentes orígenes geográficos.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* fue inhibida por los extractos de propóleo, dato que concuerda con las investigaciones realizadas por Bianchini y Bedendo (1998), Basim et al. (2006). A su vez Cmm presentó un mayor halo de inhibición en comparación a los otros géneros, esto puede deberse a la mayor sensibilidad que presentan las bacterias Gram positivas al extracto de propóleo como fue informado por Grange y Davey (1990), Castagna de Vargas et al. (2004). Sin embargo, es de destacar que este trabajo demostró que las bacterias Gram negativas *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* también pueden ser inhibidas por los EEP.

Los resultados obtenidos sobre *Ralstonia solanacearum* coinciden con Basim et al. (2006) quienes encontraron que el extracto de propóleo inhibe el crecimiento de esta bacteria.

La bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* presentó un comportamiento similar al reportado por los autores Basim et al. (2006), donde fue sensible al extracto de propóleo.

La bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* fue inhibida por el extracto etanólico de propóleo de Canelones, lo que coincide con estudios previos realizados por González et al. (2007).

Estas dos últimas bacterias únicamente fueron sensibles al EEP de Canelones, lo que podría ser explicado por la composición química de cada propóleo como ya fue mencionado anteriormente.

Las bacterias *Pectobacterium carotovora* subsp. *atroseptica*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* no resultaron sensibles al los EEP en el presente trabajo, a diferencia de lo reportado por Basim et al. (2006) que sí habían encontrado efecto inhibitorio. Bianchini y Bedendo (1998) también encontraron que *Agrobacterium tumefaciens* fue sensible al extracto de propóleo. Para el caso de *Xanthomonas citri* pv. *citri* no se encontraron reportes.

Los antecedentes científicos encontrados de Bianchini y Bedendo (1998), Basim et al. (2006) sobre el efecto de extractos de propóleos sobre bacterias fitopatógenas se realizaron con metodologías diferentes a las realizadas en el presente trabajo. Fueron utilizados distintos solventes en la preparación de los extractos (metanol, agua). De hecho, estudios realizados por González et al. (2007) indican que extractos de propóleos etanólicos y metanólicos diferían en su actividad antibacteriana. En dicho trabajo la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* mostró ser inhibida en mayor medida por los extractos etanólicos. Además en dichas investigaciones los propóleos provenían de distintos orígenes pudiendo tener propiedades antibacterianas diferentes como fue explicado anteriormente. Por estas razones podría plantearse la duda de que sean realmente comparables. No sucede lo mismo en el caso de González et al. (2007) quien utilizó la misma metodología y propóleo de la misma zona.

5.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y SU EFECTO BACTERICIDA

A partir de los estudios realizados se ha demostrado que los aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* fueron sensibles a concentraciones muy bajas de los extractos etanólicos de propóleos, confirmando que el EEP tiene una gran acción antibacteriana sobre esta bacteria.

Probablemente la diferencia de la CMI entre los dos extractos etanólicos de propóleos para un aislamiento bacteriano se deba a diferencias en el contenido de sustancias del tipo flavonoides y fenoles presentes en los propóleos, asociadas a la actividad antimicrobiana (Grange y Davey, 1990). Estos compuestos pueden variar en proporción en función del origen geográfico de los propóleos (Kujumgiev et al. 1998, Tolosa y Cañizares 2002).

Los valores de CMI del propóleo de Canelones y de Rocha presentaron efecto bactericida en el 78,5 y 28,5% de los aislamientos respectivamente (Cuadro 4). Las diferencias en la actividad bactericida de la CMI puede estar relacionada a que la mayoría de los valores de CMI del propóleo de Rocha

fueron más bajos que los de Canelones, y estas concentraciones tan bajas no fueron suficientes para ocasionar la muerte de las células bacterianas.

Además de las diferencias anteriormente dichas, se observaron que las concentraciones mínimas inhibitorias de los propóleos variaban según los aislamientos, esto hace referencia a que existen diferentes grados de sensibilidad entre los aislamientos a los EEP.

Al comparar los EEP de las dos procedencias, se observó que el EEP de Canelones tuvo mayor diámetro de inhibición en el antibiograma y una mayor CMI con un mayor efecto bactericida. Esto puede ser explicado porque existen sustancias activas en el EEP capaces de difundir en el agar en mayor medida que EEP de Rocha. Existiendo diferencias entre las metodologías utilizadas para la evaluación de los EEP.

6 CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de propóleos son herramientas potenciales de ser usadas en el manejo integrado de enfermedades bacterianas ocasionadas por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *Ralstonia solanacearum*.

Los extractos etanólicos de propóleos uruguayos son diferentes según su origen teniendo un comportamiento diferencial contra las bacterias, por lo que deberá testarse su efectividad previamente a su utilización.

De acuerdo a los resultados de los ensayos realizados no resulta factible utilizar extractos de propóleos en el manejo de enfermedades bacterianas ocasionadas por *Pectobacterium carotovora* subsp. *atroseptica*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *P. sevastanoi* pv. *sevastanoi* y *Xanthomonas citri* pv. *citri*.

Las poblaciones de bacterias presentan diferente sensibilidad a los extractos de propóleos, elemento que deberá tenerse en cuenta al momento de establecer concentraciones de uso.

En futuras investigaciones para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se deberán utilizar como punto de partida concentraciones en NAD de 0,02 a 0,3 mg.ml⁻¹ de extracto etanólico de propóleo.

7 RESUMEN

Las bacterias constituyen el tercer grupo en importancia como patógenos de plantas, existen 100 especies agrupadas en ocho géneros que producen daños en campo y poscosecha causando grandes pérdidas económicas al agricultor. La tendencia actual en la agricultura es la búsqueda de medidas de manejo respetuosas del medio ambiente, que prioricen el aprovechamiento de los recursos naturales. El propóleo es un compuesto resinoso complejo recolectado por las abejas (*Apis mellifera*) de ciertas especies vegetales, con probada acción antibacteriana. El objetivo del trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto de dos extractos etanólicos de propóleo (EEP) de distinto origen, a tres concentraciones, sobre la inhibición de crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xv), *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Xcc), *Ralstonia solanacearum* (Rs), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Pseudomonas corrugata* (Ps), *Pectobacterium carotovora* subsp. *atroseptica* (Pca), *Agrobacterium tumefaciens* (At), *Pseudomonas sevastanoi* subsp. *sevastanoi* (Pss), *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcci). Se realizaron dos ensayos, en el primero se utilizó la técnica de antibiograma de Bauer. Las bacterias fueron incorporadas al medio Nutriente Agar Dextrosa resultando una concentración de 2.5×10^7 cel.ml⁻¹. Los extractos etanólicos de propóleos se evaluaron a tres concentraciones, 40, 80 y 120 mg.ml⁻¹ y como testigo se empleó etanol 70°. En todos los casos se midió el diámetro de inhibición. El diseño experimental fue en bloques al azar con cuatro repeticiones. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas por Tukey ($\alpha=0,05$). En el segundo ensayo se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y su actividad bactericida en los extractos de propóleo únicamente para Cmm. Los dos extractos de propóleos inhibieron el crecimiento de Cmm en todas las concentraciones evaluadas. Se encontraron diferencias entre la actividad inhibitoria de ambos extractos. Las bacterias fitopatógenas Cmm, Xcv, Xcc y Rs presentaron un halo de inhibición significativamente mayor con respecto al testigo en alguna de las concentraciones evaluadas. Cmm presentó los mayores diámetros de inhibición frente a ambos propóleos, diferenciándose del resto. Los valores de CMI oscilaron entre 0,02 – 0,3 mg.ml⁻¹ para el EEP de Rocha y 0,04 – 0,3 mg.ml⁻¹ para EEP de Canelones. Cmm puede ser inhibida con concentraciones de 0,02 a 0,3 mg.ml⁻¹ de extracto etanólico de propóleo en NAD, existiendo diferencias marcadas entre los efectos bactericidas de la CMI de ambos propóleos. El extracto de propóleo podría tener un potencial uso en el manejo de enfermedades bacterianas en los cultivos.

Palabras clave: Propóleo; MIP; Bacterias fitopatógenas.

8 SUMMARY

Bacteria are the third group in importance as a pathogen of plants, 100 species are grouped in eight genera that occur in the field and postharvest damage causing great economic losses to farmers. The current trend in agriculture is the use of environmentally sound management measures that confer priority to the use of natural resources. Propolis is a complex resinous compound collected by bees (*Apis mellifera*) from certain plant species, with proven antibacterial action. The objective was to evaluate *in vitro* the effect of two ethanolic extracts of propolis (EEP) from different sources, at three concentrations on the inhibition of growth of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xv), *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Xcc), *Ralstonia solanacearum* (Rs), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Pseudomonas corrugata* (Ps), *Pectobacterium carotovora* subsp. *atroseptica* (Pca), *Agrobacterium tumefaciens* (At), *Pseudomonas savastanoi* subsp. *savastanoi* (Pss), *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcci). Two trials were conducted, in the first the Bauer susceptibility test was used. The bacteria were incorporated into Dextrose Agar Nutrient medium at concentration of 2.5×10^7 cel.ml⁻¹. The ethanol extracts of propolis were tested at three concentrations, 40, 80 and 120 mg.ml⁻¹ and ethanol 70° was used as control. The diameter of the inhibition zone was measured. The experimental design was a randomized block with four replications. Results were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and means were compared by Tukey ($\alpha = 0.05$). In the second trial, the minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal activity of extracts of propolis were determined only for Cmm. The two extracts of propolis inhibited the growth of Cmm at all tested concentrations. Differences were found between the inhibitory activities of the two extracts. The inhibition zone was significantly higher for Cmm, Xcv, Xcc and Rs compared with the control in at least one of the concentrations tested. Cmm had the largest diameters of inhibition with both propolis. MIC values ranged from 0.02 to 0.3 mg.ml⁻¹ to EEP Rocha and 0.04 to 0.3 mg.ml⁻¹ to EEP Canelones. Cmm was inhibited by concentrations of 0.02 to 0.3 mg.ml⁻¹ of ethanol extract of propolis in NAD, there were marked differences between the bactericidal effects of the MIC of both propolis. Propolis extracts have potential for the management of bacterial diseases in crops.

Key words: Propolis; IPM; Phytopatogenic bacteria.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. ADASKAVEG, J. E.; HINE R. B. 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. Plant Dis. 69: 993-996
2. AGRIOS, G. N. 2005. Plant pathology. 5th. ed. México, Elsevier. 921 p.
3. AKOPYAN, Z.M.; SHAKARYAN, G.A.; DANIELYAN, S.G. 1970. Sensitivity of microorganism to propolis in some districts of the Armenian S.S.R. Biol. Zh. Armeniya. 23(9): 70-74.
4. ALLERBERGER, F.; GROSSGUT, P.R.; SCHÖNBAUER, M.; WÜRZNER, H. 2002. Antibiotics in horticulture and antibiotic feed additives in animal husbandry, Austria. Wien. Klin. Wochenschr. 115 (17-18): 615-617
5. AMOROS, M.; LURTON, E.; BOUSTIC, J.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. 1994. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-enyl caffeate. J Nat Prod. 57: 644-647.
6. ASÍS, M. 1989 Los productos de la colmena. Vedado, La Habana, Cuba, Centro de Información y Documentación Agropecuario. cap. 4, pp. 45 – 52.
7. AVILLA, J.; TELIS, V. 2003. Antecedentes de la producción integrada en el mundo. In: Luna, H. ed. Producción Integrada en Uruguay; el programa de producción integrada. Montevideo, PREDEG/GTZ. pp. 33-39.
8. BANKOVA, V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Ethnopharmacol. 100: 114-117.
9. BARBERÁ, C. 1989. Pesticidas agrícolas. 4^a.ed. Barcelona, Omega. 603 p.
10. BARBOSA-MEDEIROS, C.A.; STRASSBURGER, A.S.; BAUER GOMES, C.; WOLFF, L.F. 2007. Controle alternativo de requeima (*Phytophthora infestans*) em batata cultivada em

sistema de base ecológica. (en línea). Pelotas, RS, EMBRAPA Clima Temperado. 5 p. Consultado 22 set. 2009. Disponible en <http://www.pronaf.gov.br/dater/arquivos/2014419941.pdf>

11. BASIM, E.; BASIM, H.; ÖZCAN, M. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *J Food Eng.* 77: 992-996.
12. BAUER A. W., KIRBY M. M., SHERRIS J. C., TURCK M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
13. BIANCHINI, L.; BEDENDO, I.P. 1998. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogénicas. (en línea). *Sci. Agrícola.* 55(1): 149-152. Consultado 23 jul. 2007. Disponible en http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161998000100024&lng=es&nrm=iso.
14. BLANCARD, D. 1992. Enfermedades del tomate; observar, identificar, luchar. Madrid, Mundi-Prensa. 212 p.
15. BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J. 1997. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 35:2184–2185.
16. BOHLMAN, F.; KRAMP, W.; GRENZ, M.; ROBINSON, H.; KING, R. 1981. Diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry* 20: 1907-1913.
17. BOLTON, L. F.; KELLY, L.; LEE, M. D.; CRAY, P.F.; MAURER, J. J. 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella* enteric serotype Typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *J. Clin. Microbiol.* 37:1348–1351.
18. BRUSHI, M.L.; FRANCO, S.L.; GREMIAO, M.P. 2003. Application of an HPLC method for analysis of propolis extract. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 26(14): 2399-2409.

19. BURDOCK, G.A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36 (4): 347-363.
20. CAB INTERNATIONAL. 2005. Crop protection compendium. Wallingford, UK. 1 disco compacto, 8 mm.
21. CASSANELLO, M.E.; NUÑEZ, C.A.; SCATTOLINI, A. 2006. Enfermedades de las cucurbitáceas en el Litoral Norte de Uruguay. Salto, Uruguay, Comisión Sectorial de Educación Permanente. 96 p.
22. CASTAGNA DE VARGAS, A.; PINTO LOGUERCIO, A.; MAZZINI WITT, N.; MATIUZZI DA COSTA, M.; SÁ E SILVA, M.; RIBEIRO VIANA, L. 2004 Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcohólico de própolis. *Cienc. Rural* 34(1): 159-163.
23. CHAILLOU, L.L. 2004. Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas.* 24(1): 011-015
24. CONLIN, K.C.; MCCARTER, S.M. 1983. Effectiveness of selected chemicals in inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in vitro and in controlling bacterial speck. *Plant Dis.* 67:(6) 639-644.
25. COOK, A. A.; STALL, R. E. 1982. Distribution of races of *Xanthomonas vesicatoria* pathogenic on pepper. *Plant Dis.* 66:388-389.
26. COOKSEY, D. A. 1990. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 201-219.
27. CORTÉS RUBIRA, J. 2008. Evaluación del efecto de extractos etanólicos de própolis sobre el control de *Alternaria solani* en cultivo ecológico de tomate (*Solanum lycopersicum*). Tesis de Ingeniería Técnica Agrícola. Barcelona, España. Universidad Politécnica de Cataluña. 72 p.
28. DA SILVA ROMEIRO, R. 2000. Bactérias fitopatogênicas. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 283 p.

29. _____. 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 279 p.
30. DE CAMPO, R.; PAULINO, N.; DA SILVA, C.; SCREMIN, A.; CALIXTO, J. 1998. Antihyperalgesic effect of an ethanolic extract of Propolis in mice and rats. *J Pharm Pharmacol.* 50: 1187-1193.
31. DEL RIO MARTINEZ, P.I. 2006. Actividad biocida de un propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis* estudio in vitro. Tesis Cirujano Dentista. Santiago, Chile. Facultad de Odontología. Universidad de Chile. 130 p.
32. DOBROWOLSKI, J.W.; VOHORA, S.B.; SHARMA, K.; SHAH, S.A.; NAQVI, S.A.H.; DANDIYA, P.C. 1991. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol.* 35(1):77-82.
33. EPPO. 2005a. Data sheets on quarantine pest. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. (en línea). Paris. 5 p. Consultado 12 ago. 2009. Disponible en http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_michiganensis/CORBMI_ds.pdf
34. _____. 2005b. Data sheets on quarantine pests. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. (en línea). Paris. 8 p. Consultado 11 ago. 2009. Disponible en http://www.eppo.org/QUARENTINE/bacteria/Xanthomonas_citri/XANTCIT_ds.pdf
35. _____. 2005c. Data sheets on quarantine pests. *Xanthomonas vesicatoria*. (en línea). Paris. 6 p. Consultado 11 ago. 2009. Disponible en http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas_vesicatoria/XANTVE_ds.pdf.
36. FAO. 2003. Normas internacionales para medidas fitosanitarias; Plagas no cuarentenarias reglamentadas; concepto y aplicación. NIMF N° 16 (en línea). Roma. Consultado 11 de ago. 2009. Disponible en

http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=//docrep/007/y4223s/y4223s05.htm

37. GARDAN, L.; GOUY, C.; CHRISTEN, R.; SAMSON, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level; *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 53: 381 - 391.
38. GEBARA, E.; ZARDETTO, C.; MAYER, M. 1996. "In Vitro" study of the antimicrobial activity of natural substances against *S. mutans* and *S. sobrinus*. Rev Odontol Univ Sao Paulo. 10: 251-256.
39. GHISALBERTI, E. L. 1979. Propolis; a review. Bee World. 60:58-84.
40. GONZÁLEZ, P.; RAUDUVINICHE, L.; MONDINO, P.; GEPP, V.; ZACCARI, F.; DE AURRECOECHEA, I.; CRACCO, P. 2007. El propóleo como alternativa al control químico de enfermedades hortícolas. In: Congreso Nacional de Hortifruticultura (11º), Congreso de la Sociedad Uruguaya de Horti-Fruticultura (11º). Congreso Panamericano de Promoción del Consumo de Frutas y Hortalizas (3º., 2007, Montevideo). Poster. Montevideo, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).
41. _____.; SANTOS, C.; SILVERA, E.; SOLIER, S.; ZÁCCARI, F. 2002. Situación sanitaria del cultivo de zapallo kabutiá. In: Seminario de Actualización en el Cultivo de Zapallo (2º., 2002, Canelones, Las Brujas). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 46-51.
42. GOTO, M.; HIKOTA, T.; NAKAJIMA, M.; TAKIKAWA, Y.; TSUYUMU, S. 1994. Occurrence and properties of copper-resistance in plant pathogenic bacteria. Phytopath. Soc. Japan. 60:147-153.
43. GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. 1990. Antibacterial properties of propolis (Bee glue). J. of the Royal Society of Medicine. 83(3):159-160.

44. GREENAWAY, W.; ENGLISH, S.; WOLLENWEBER, E.; WHATLEY, F.R. 1989. Series of novel flavanones identified by gas chromatography-mass spectrometry in bud exudates of *Populus fremontii* and *Populus maximowiczii*. J Chromatogr. 481: 352-357
45. HAVSTEEN, B. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Ther. 96(2-3): 67-202
46. HAYACIBARA, M.F. 2004. Avaliação do potencial anti-cárie e anti-placa de frações isoladas de Própolis de Apis mellifera selecionadas de duas regiões do Brasil. Tesis Doctor en Odontologia. Piracicaba, Brasil. Universidad Estadual de Campinas. 49 p.
47. HEO, M.Y.; SOHIN, J.; AU, W. 2001. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. Mutat Res. 488: 135-150
48. HERNÁNDEZ, Y.; MARIÑO, N.; TRUJILLO, G., URBINA DE NAVARRO, C. 2005. Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 22: 181-190
49. IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. 1991. Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res. 25: 347-351.
50. IVANOVSKA, N.; DIMOV, V.; BANKOVA, V.; POPOV, S. 1995. Inmunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity in vivo. J Ethnopharmacol. 47: 145-147.
51. KATIRCIOGLU, H.; MERCAN, N. 2006. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. Afr J Biotechnol. 5(11):1151-1153.
52. KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S. 1993. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. Drugs Exp Clin Res. 19(5): 197-203.
53. KIDERMAN, A.; TORTEN, R.; FURST, A.; REINUS, K. 2001. Bilateral eosinophilic ulcers in an infant treated with propolis. J Dermatol Treat. 12: 29-31.

54. KIMATI, H. 1995. Controle químico. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. eds. Manual de Fitopatología; princípios y conceitos. Sao Paulo, Agronomica Ceres. v. 1, pp. 761-785.
55. KOO, H. 2000. Effects of Apis mellifera propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hidroxyapatite. Caries Res. 34(5): 361-442.
56. KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. 2005. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. Acta Pharm. 55: 423-430.
57. KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJEVA, Y.U.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J. Ethnopharmacol. 64 (3): 235–240.
58. KUMAZAWA, S.; KATSUMI, H.; KATSUKO, K.; ISHII, T.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. 2002. Studies of the constituents of Uruguayan Propolis. J Agric Food Chem. 50: 4777-4782.
59. _____; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chem. 84: 329–339.
60. LECIGNE, P.; BEZERT, J.; MERCY, L.; PRUNET, J. P.; GINIBRE, T.; GARCIN, A.; VERHAEGHE, A.; GUILLAUMES, J.; MANCEAU, C. 2000. Mancozeb, copper and bacteriosis. Phytom. no. 531: 13-16.
61. LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. 1997. Doenças bacterianas das hortaliças; diagnose e control. Brasília, EMBRAPA-CNPQ. 70 p.
62. _____. 2000. Bacterioses de hortaliças; situação atual e perspectivas de controle. In: Zambolim, L. ed. Manejo Integrado; doenças, pragas e plantas daninhas. Viçosa, MG, UFV. pp. 187-208.

63. LÓPEZ, M. M.; MONTESINOS, E. 1996. Enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. *In*: Lácer, G.; Lopez, M. M.; Traperó, A.; Bello, A. eds. Patología vegetal. Valencia, Sociedad Española de Fitopatología. t.1, pp. 515-558
64. LU, L.; CHEN, Y.; CHOU, C. 2005. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol.* 102: 213-220.
65. MACMANUS, P. S.; STOCKWELL, V. O. 2000. Antibiotics for plant disease control; silver bullets or rusty sabers? (en línea). s.l., The American Phytopathological Society. Apsnet Feature. s.p. Consultado 3 jun. 2010. Disponible en <http://www.apsnet.org/online/feature/antibiotics/>
66. _____.; _____. 2001. Antibiotic use for plant disease management in the United States. (en línea). s.l. Plant Health Progress. s.p. Consultado 27 may. 2011. Disponible en <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/antibiotic/>
67. _____.; _____.; SUNDIN, G. W.; JONES, A. L. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol.* 40: 443-465.
68. MAESO, D.; FERNANDEZ, A. 2010. Momentos de aplicación de funguicidas cúpricos para el control de mancha bacteriana del tomate (*Xantomonas* spp.). *In*: Congreso Nacional de Horti-Fruticultura (12º, 2010, Montevideo, Uruguay). Protección hortícola. Montevideo, INIA. p. 74.
69. MARCO, G. M.; STALL, R. E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Dis.* 67:779-781.
70. MARCUCCI, M.C. 1995. Propolis; chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* 26: 83-89
71. _____. 1996. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim Nova.* 15(5):529-536

72. _____.; BANKOVA, V. 1999. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. *Current Top Phytochem.* 2: 115-123
73. _____.; FERRERES F.; GARCÍA-VIGUERA C.; BANKOVA V. S.; DE CASTRO S. L.; DANTAS A. P.; VALENTE P. H. M.; PAULINO N. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* 74: 105-112
74. MIRIK, M.; AYSAN, Y.; CINAR, O. 2007. Copper – resistant strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye in the Eastern Mediterranean region of Turkey. *J Plant Pathol.* 89(1):153-154.
75. MOLINA, J. J.; HARRISON, M. D. 1980. The role of *Erwinia carotovora* in the epidemiology of potato blackleg. II. The effect of soil temperature on disease severity. *Am J Potato Res.* 57(8):351-363.
76. MONDINO, P. 2001. Manejo de la resistencia a fungicidas. Montevideo, Facultad de Agronomía. 12 p.
77. _____.; VERO, S. 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Montevideo, Facultad de Agronomía. 158 p.
78. MONTELONGO, M. J.; PÉREZ-FAGGIANI, E.; GONZÁLEZ, P.; MAESO, D. 2010. Evaluación de la sensibilidad in vitro a cobre, estreptomycin y kasugamicina de *Xanthomonas* spp. causantes de la “Mancha Bacteriana” del tomate en Uruguay. In: Congreso Nacional de Horti-Fruticultura (12º, 2010, Montevideo, Uruguay). Protección hortícola. Montevideo, Facultad de Agronomía. p. 77.
79. MONTESINOS, E.; BELTRÁ, R. 1996. Las bacterias fitopatógenas. In: Liácer, G.; Lopez, M. M.; Trapero, A.; Bello, A. eds. Patología vegetal. Valencia, Sociedad Española de Fitopatología. t.1, pp. 491-514
80. NICO, A. I.; ALIPPI A. M.; DAL, BO, E.; RONCO, L. B. 2006. Interacción de *Pseudomonas corrugata* y *Pseudomonas*

viridiflava y diferentes genotipos de tomate. Rev. Fac. Agron. 106 (1): 37-45.

81. OBASA, K.C.; ADEOTI, A.Y.A.; ENIKUOMEHIN, O.A.; BODUNDE, J.G. 2007. Efficacy of bee-propolis in the control of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) briosi and cav. In vitro. Res J Microbiol. 2 (2): 175-179.
82. OJEDA-CONTRERAS, A.J.; HERNANDEZ-MARTINEZ, J.; DOMINGUEZ, Z.; MERCADO-RUIZ, J.N.; TRONCOSO-ROJAS, R.; SANCHEZ-ESTRADA, A.; TIZNADO-HERNANDEZ, M.E. 2008. Utilization of caffeic acid Phenethyl ester to control *Alternaria alternata* rot in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Fruit. J. Phytopathology. 156:164–173.
83. OMS. 2001. Estrategia mundial OMS de contención de la resistencia a los antimicrobianos; resumen. (en línea). Ginebra. 11 p. Consultado 3 jun. 2010. Disponible en http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_resumen.pdf
84. _____. 2005. La contención de la resistencia a los antimicrobianos. Perspectivas políticas de la OMS sobre medicamentos. (en línea). Ginebra. 6 p. Consultado 3 jun. 2010. Disponible en http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist_OMS_la_contencion_de_la_resis_antimicrob.pdf
85. ÖZCAN, M. 2000. Uso de extracto de propóleos como antioxidante natural para aceites vegetales. Grasas y Aceites. 51(4): 251-253.
86. _____.; ÜNVER, A.; CEYLAN, D.A.; YETISIR, R. 2004. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. Mol Nutr Food Res. 48(3) 188-194.
87. PAGANI C.; SILVERA E. 1998. Determinación del momento de infección en fruta de duraznero y control químico de “mancha bacteriana” (*Xanthomonas arborícola* pv. *pruni*) en el Uruguay. In: Reunión Técnica sobre Protección Vegetal en Frutales (1998, Las Brujas, Canelones). Trabajos

presentados. Montevideo, INIA. pp. 5-11 (Actividades de Difusión no. 178).

88. PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A; ALCICI, N.M. 1998a. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. Ciênc. Tecnol. Aliment. 18 (3): 313-318.
89. _____.; _____. 1998b. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(11): 2230-2232.
90. PENYALVER, R.; GARCIA, A.; FERRER, A; BERTOLINI, E.; LOPEZ, M. M. 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. Am Soc Microbiol. 66(6):2673-2677.
91. PÉREZ-MARTÍNEZ, I.; ZHAO, Y.; MURILLO, J.; SUNDIN, G.W.; RAMOS, C. 2008. Global Genomic Analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Plasmids. J. Bacteriol. 190(2): 625 - 635.
92. PIDDOCK, L. J. V. 1996. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? J. Antimicrob. Chemother. 38:1-3.
93. POPOVA, M.; SILICI, S.; KAFTANOGLU, O.; BANKOVA, V. 2005. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine. 12(3) 221-228.
94. POWELSON, M.L. 1985. Potato early dying disease in the Pacific Northwest caused by *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* and *E. carotovora* pv. *atroseptica*. Am J Potato Res. 69(4): 173-176.
95. QUEZADO-DUVAL, A. M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; CAMARGO, L. E. A. 2003. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas á mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. Hort. Brasil. Brasília. 21(4):670-675.

96. RITCHIE, D. F.; DITTAPONGPITCH, V. 1991. Copper and streptomycin – resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Dis.* 75:733-736.
97. RUSSO, N. L.; BURR, T. J.; BRETH, D. I.; ALWINCKLE, H. S. 2008. Isolation of streptomycin – resistant isolates of *Erwinia amylovora* in New York. *Plant Dis.* 92:714-718.
98. SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; MOREIRA, E.S.A.; BRAGA, F.C. 2002. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 80: 1-7.
99. SAS INSTITUTE. 2006. SAS OnlineDoc 9.1.3. (en linea). Cary, NC. s.p. Consultado 23 may. 2009. Disponible en <http://support.sas.com/onlinedoc/913/docMainpage.jsp>
100. SAWAYA A.; PALMA A.; CAETANO F.; MARCUCCI M.; DA SILVA CUNHA I.; ARAUJO C.; SHIMIZU M. 2002. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol.* 35: 203-207
101. SCHECK, H. J.; PSCHIEDT, J. W.; MOORE, L. W. 1996. Copper and streptomycin resistance in strains of *Pseudomonas syringae* from Pacific Northwest nurseries. *Plant Dis.* 80:1034-1039.
102. SILBERGELD, E.K.; GRAHAM, J.; PRICE, L.B. 2008. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu Rev Publ Health.* Vol. 29: 151-169.
103. SIMÕES, C.C.; ARAÚJO, D.B.; ARAÚJO, R.P.C. 2008. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Rev Bras Farmacogn.* 18: 84-89.
104. SPAZIANI-PEREIRA, C.; GUIMARAENS, R.J.; POZZA, E. A.; ALVES DA SILVA, A. 2008. Controle da cercosporiose e da

ferrugem do cafeeiro com extrato etanólico de própolis.
Ceres. 55(5):369-376

105. STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. 1983. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast States. *Plant Dis.* 67(5):581-585.
106. STEPANOVIC, S.; ANTIC, N.; DAKIC, I.; SVABIC-VLAHOVIC, S. 2003. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res.* 158: 353-357
107. SWARTZ, M. N. 2002. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clin Infect Dis.* 34 (3): 111-122
108. TAKAISI-KIKUNI, N.B.; SCHILCHER, H. 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.* 60: 222-227.
109. TOLOSA, L.; CAÑIZARES, E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharm.* 43(1-2): 187-204.
110. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCION GENERAL DE SERVICIOS AGRICOLAS. 2010. División análisis y diagnostico. Productos fitosanitarios. Planilla Excel. Lista de registros vigentes. (en línea). Montevideo. s. p. Consultado 10 jun. 2010. Disponible en http://www.mgap.gub.uy/dgssaa/DivAnalisisDiagnostico/DAY_D_PROFIT.htm
111. VALCIC, S.; MONTENEGRO, G.; MUJICA, A.M.; AVILA, G.; FRANZBLAU, S.; SINGH, M.P.; MAIESE, W.M.; TIMMERMEANN, B.N. 1999. Phytochemical, morphological, and biological investigations of propolis from central Chile. *Z Naturforsch.* 54: 406-416.
112. VIDAVER, A. K. 2002. Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clin Infect Dis.* 34 (Supp. 3): 107-110.

113. WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. 1994. Biological control of postharvest diseases; theory and practice. Boca Raton, FL, CRC. 182 p.
114. YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.; proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. y *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiol. Immunol. 39:897-904.
115. YUSUF, Y.; DURDANE, Y.; SERVET, A. 2005. Antifungal activity of Turkish propolis against *Phytophthora* species. Plant Pathol J. 4 (1): 58-60.

10 ANEXOS

Anexo No. 1: Medios de Cultivo.

Medio de cultivo: Nutriente Agar Dextrosado (NAD)

Ingredientes:

Nutriente Agar.....23 gr (Oxoid)
Dextrosa.....5 gr (Difco Laboratories)
Agua destilada estéril.....1000 ml

Medio de cultivo: Nutriente Broth Dextrosado (NBD)

Ingredientes:

Nutriente Broth.....8 gr (Oxoid)
Dextrosa.....5 gr (Difco Laboratories)
Agua destilada estéril.....1000 ml

Anexo No. 2: Antibiograma: Planilla de datos originales.

| BACTERIA | BLOQUE | TRATAMIENTO | DIÁMETRO DE INHIBICIÓN |
|-----------------|---------------|--------------------|-------------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 12,7 |
| 1 | 1 | 2 | 12,7 |
| 1 | 1 | 3 | 12,7 |
| 1 | 1 | 4 | 12,7 |
| 1 | 1 | 5 | 12,7 |
| 1 | 1 | 6 | 12,7 |
| 1 | 1 | 7 | 12,7 |
| 1 | 2 | 1 | 12,7 |
| 1 | 2 | 2 | 12,7 |
| 1 | 2 | 3 | 12,7 |
| 1 | 2 | 4 | 12,7 |
| 1 | 2 | 5 | 12,7 |
| 1 | 2 | 6 | 12,7 |

| | | | |
|---|---|---|-------|
| 1 | 2 | 7 | 12,7 |
| 1 | 3 | 1 | 12,7 |
| 1 | 3 | 2 | 12,7 |
| 1 | 3 | 3 | 12,7 |
| 1 | 3 | 4 | 12,7 |
| 1 | 3 | 5 | 12,7 |
| 1 | 3 | 6 | 12,7 |
| 1 | 3 | 7 | 12,7 |
| 1 | 4 | 1 | 12,7 |
| 1 | 4 | 2 | 12,7 |
| 1 | 4 | 3 | 12,7 |
| 1 | 4 | 4 | 12,7 |
| 1 | 4 | 5 | 12,7 |
| 1 | 4 | 6 | 12,7 |
| 1 | 4 | 7 | 12,7 |
| 4 | 1 | 1 | 14,99 |
| 4 | 1 | 2 | 16,5 |
| 4 | 1 | 3 | 12,7 |
| 4 | 1 | 4 | 12,7 |
| 4 | 1 | 5 | 12,7 |
| 4 | 1 | 6 | 12,7 |
| 4 | 1 | 7 | 13,6 |
| 4 | 2 | 1 | 15,25 |
| 4 | 2 | 2 | 15,29 |
| 4 | 2 | 3 | 12,7 |
| 4 | 2 | 4 | 14,96 |
| 4 | 2 | 5 | 12,7 |
| 4 | 2 | 6 | 12,7 |
| 4 | 2 | 7 | 14,68 |
| 4 | 3 | 1 | 12,7 |
| 4 | 3 | 2 | 14,46 |
| 4 | 3 | 3 | 12,7 |
| 4 | 3 | 4 | 12,7 |
| 4 | 3 | 5 | 12,7 |
| 4 | 3 | 6 | 12,7 |
| 4 | 3 | 7 | 12,7 |
| 4 | 4 | 1 | 14,55 |
| 4 | 4 | 2 | 14,75 |
| 4 | 4 | 3 | 12,7 |
| 4 | 4 | 4 | 12,7 |
| 4 | 4 | 5 | 12,7 |

| | | | |
|---|---|---|-------|
| 4 | 4 | 6 | 12,7 |
| 4 | 4 | 7 | 13,58 |
| 5 | 1 | 1 | 24,7 |
| 5 | 1 | 2 | 24,73 |
| 5 | 1 | 3 | 23,35 |
| 5 | 1 | 4 | 22,78 |
| 5 | 1 | 5 | 12,7 |
| 5 | 1 | 6 | 23,48 |
| 5 | 1 | 7 | 24,4 |
| 5 | 2 | 1 | 22,18 |
| 5 | 2 | 2 | 25,32 |
| 5 | 2 | 3 | 20,41 |
| 5 | 2 | 4 | 21,3 |
| 5 | 2 | 5 | 12,7 |
| 5 | 2 | 6 | 22,04 |
| 5 | 2 | 7 | 24,66 |
| 5 | 3 | 1 | 23,55 |
| 5 | 3 | 2 | 24,31 |
| 5 | 3 | 3 | 19,93 |
| 5 | 3 | 4 | 23,05 |
| 5 | 3 | 5 | 12,7 |
| 5 | 3 | 6 | 24,37 |
| 5 | 3 | 7 | 25,5 |
| 5 | 4 | 1 | 21,72 |
| 5 | 4 | 2 | 23,95 |
| 5 | 4 | 3 | 22,06 |
| 5 | 4 | 4 | 23,33 |
| 5 | 4 | 5 | 12,7 |
| 5 | 4 | 6 | 24,53 |
| 5 | 4 | 7 | 24,52 |
| 6 | 1 | 1 | 12,7 |
| 6 | 1 | 2 | 12,7 |
| 6 | 1 | 3 | 12,7 |
| 6 | 1 | 4 | 12,7 |
| 6 | 1 | 5 | 12,7 |
| 6 | 1 | 6 | 12,7 |
| 6 | 1 | 7 | 12,7 |
| 6 | 2 | 1 | 12,7 |
| 6 | 2 | 2 | 12,7 |
| 6 | 2 | 3 | 12,7 |
| 6 | 2 | 4 | 12,7 |

| | | | |
|---|---|---|-------|
| 6 | 2 | 5 | 12,7 |
| 6 | 2 | 6 | 12,7 |
| 6 | 2 | 7 | 12,7 |
| 6 | 3 | 1 | 12,7 |
| 6 | 3 | 2 | 12,7 |
| 6 | 3 | 3 | 12,7 |
| 6 | 3 | 4 | 12,7 |
| 6 | 3 | 5 | 12,7 |
| 6 | 3 | 6 | 12,7 |
| 6 | 3 | 7 | 12,7 |
| 6 | 4 | 1 | 12,7 |
| 6 | 4 | 2 | 12,7 |
| 6 | 4 | 3 | 12,7 |
| 6 | 4 | 4 | 12,7 |
| 6 | 4 | 5 | 12,7 |
| 6 | 4 | 6 | 12,7 |
| 6 | 4 | 7 | 12,7 |
| 7 | 1 | 1 | 15,92 |
| 7 | 1 | 2 | 16,42 |
| 7 | 1 | 3 | 12,7 |
| 7 | 1 | 4 | 13,8 |
| 7 | 1 | 5 | 12,7 |
| 7 | 1 | 6 | 12,7 |
| 7 | 1 | 7 | 14,25 |
| 7 | 2 | 1 | 14,33 |
| 7 | 2 | 2 | 14,93 |
| 7 | 2 | 3 | 12,7 |
| 7 | 2 | 4 | 13,15 |
| 7 | 2 | 5 | 12,7 |
| 7 | 2 | 6 | 12,7 |
| 7 | 2 | 7 | 16 |
| 7 | 3 | 1 | 15,5 |
| 7 | 3 | 2 | 18,9 |
| 7 | 3 | 3 | 12,7 |
| 7 | 3 | 4 | 14,02 |
| 7 | 3 | 5 | 12,7 |
| 7 | 3 | 6 | 12,7 |
| 7 | 3 | 7 | 15,11 |
| 7 | 4 | 1 | 14,42 |
| 7 | 4 | 2 | 16,37 |
| 7 | 4 | 3 | 12,7 |

| | | | |
|---|---|---|-------|
| 7 | 4 | 4 | 13,41 |
| 7 | 4 | 5 | 12,7 |
| 7 | 4 | 6 | 12,7 |
| 7 | 4 | 7 | 13,41 |
| 8 | 1 | 1 | 12,7 |
| 8 | 1 | 2 | 12,7 |
| 8 | 1 | 3 | 12,7 |
| 8 | 1 | 4 | 12,7 |
| 8 | 1 | 5 | 12,7 |
| 8 | 1 | 6 | 12,7 |
| 8 | 1 | 7 | 12,7 |
| 8 | 2 | 1 | 12,7 |
| 8 | 2 | 2 | 12,7 |
| 8 | 2 | 3 | 12,7 |
| 8 | 2 | 4 | 12,7 |
| 8 | 2 | 5 | 12,7 |
| 8 | 2 | 6 | 12,7 |
| 8 | 2 | 7 | 12,7 |
| 8 | 3 | 1 | 12,7 |
| 8 | 3 | 2 | 12,7 |
| 8 | 3 | 3 | 12,7 |
| 8 | 3 | 4 | 12,7 |
| 8 | 3 | 5 | 12,7 |
| 8 | 3 | 6 | 12,7 |
| 8 | 3 | 7 | 12,7 |
| 8 | 4 | 1 | 12,7 |
| 8 | 4 | 2 | 12,7 |
| 8 | 4 | 3 | 12,7 |
| 8 | 4 | 4 | 12,7 |
| 8 | 4 | 5 | 12,7 |
| 8 | 4 | 6 | 12,7 |
| 8 | 4 | 7 | 12,7 |
| 9 | 1 | 1 | 12,7 |
| 9 | 1 | 2 | 12,7 |
| 9 | 1 | 3 | 12,7 |
| 9 | 1 | 4 | 12,7 |
| 9 | 1 | 5 | 12,7 |
| 9 | 1 | 6 | 12,7 |
| 9 | 1 | 7 | 12,7 |
| 9 | 2 | 1 | 12,7 |
| 9 | 2 | 2 | 12,7 |

| | | | |
|----|---|---|-------|
| 9 | 2 | 3 | 12,7 |
| 9 | 2 | 4 | 12,7 |
| 9 | 2 | 5 | 12,7 |
| 9 | 2 | 6 | 12,7 |
| 9 | 2 | 7 | 12,7 |
| 9 | 3 | 1 | 12,7 |
| 9 | 3 | 2 | 12,7 |
| 9 | 3 | 3 | 12,7 |
| 9 | 3 | 4 | 12,7 |
| 9 | 3 | 5 | 12,7 |
| 9 | 3 | 6 | 12,7 |
| 9 | 3 | 7 | 12,7 |
| 9 | 4 | 1 | 12,7 |
| 9 | 4 | 2 | 12,7 |
| 9 | 4 | 3 | 12,7 |
| 9 | 4 | 4 | 12,7 |
| 9 | 4 | 5 | 12,7 |
| 9 | 4 | 6 | 12,7 |
| 9 | 4 | 7 | 12,7 |
| 10 | 1 | 1 | 13,97 |
| 10 | 1 | 2 | 16,58 |
| 10 | 1 | 3 | 12,7 |
| 10 | 1 | 4 | 12,7 |
| 10 | 1 | 5 | 12,7 |
| 10 | 1 | 6 | 13,6 |
| 10 | 1 | 7 | 15,49 |
| 10 | 2 | 1 | 13,05 |
| 10 | 2 | 2 | 16,74 |
| 10 | 2 | 3 | 12,7 |
| 10 | 2 | 4 | 14,08 |
| 10 | 2 | 5 | 12,7 |
| 10 | 2 | 6 | 12,7 |
| 10 | 2 | 7 | 14,53 |
| 10 | 3 | 1 | 13,2 |
| 10 | 3 | 2 | 14,89 |
| 10 | 3 | 3 | 12,7 |
| 10 | 3 | 4 | 12,82 |
| 10 | 3 | 5 | 12,7 |
| 10 | 3 | 6 | 12,7 |
| 10 | 3 | 7 | 13,27 |
| 10 | 4 | 1 | 13,45 |

| | | | |
|----|---|---|-------|
| 10 | 4 | 2 | 16,43 |
| 10 | 4 | 3 | 12,7 |
| 10 | 4 | 4 | 12,7 |
| 10 | 4 | 5 | 12,7 |
| 10 | 4 | 6 | 12,7 |
| 10 | 4 | 7 | 14,66 |
| 11 | 1 | 1 | 12,7 |
| 11 | 1 | 2 | 13,58 |
| 11 | 1 | 3 | 12,7 |
| 11 | 1 | 4 | 12,7 |
| 11 | 1 | 5 | 12,7 |
| 11 | 1 | 6 | 12,7 |
| 11 | 1 | 7 | 12,7 |
| 11 | 2 | 1 | 12,7 |
| 11 | 2 | 2 | 13,38 |
| 11 | 2 | 3 | 12,7 |
| 11 | 2 | 4 | 12,7 |
| 11 | 2 | 5 | 12,7 |
| 11 | 2 | 6 | 12,7 |
| 11 | 2 | 7 | 12,7 |
| 11 | 3 | 1 | 12,7 |
| 11 | 3 | 2 | 12,7 |
| 11 | 3 | 3 | 12,7 |
| 11 | 3 | 4 | 12,7 |
| 11 | 3 | 5 | 12,7 |
| 11 | 3 | 6 | 12,7 |
| 11 | 3 | 7 | 12,9 |
| 11 | 4 | 1 | 12,7 |
| 11 | 4 | 2 | 12,7 |
| 11 | 4 | 3 | 12,7 |
| 11 | 4 | 4 | 12,7 |
| 11 | 4 | 5 | 12,7 |
| 11 | 4 | 6 | 12,7 |
| 11 | 4 | 7 | 12,7 |
| 12 | 1 | 1 | 12,7 |
| 12 | 1 | 2 | 12,7 |
| 12 | 1 | 3 | 12,7 |
| 12 | 1 | 4 | 12,7 |
| 12 | 1 | 5 | 12,7 |
| 12 | 1 | 6 | 12,7 |
| 12 | 1 | 7 | 12,7 |

| | | | |
|----|---|---|------|
| 12 | 2 | 1 | 12,7 |
| 12 | 2 | 2 | 12,7 |
| 12 | 2 | 3 | 12,7 |
| 12 | 2 | 4 | 12,7 |
| 12 | 2 | 5 | 12,7 |
| 12 | 2 | 6 | 12,7 |
| 12 | 2 | 7 | 12,7 |
| 12 | 3 | 1 | 12,7 |
| 12 | 3 | 2 | 12,7 |
| 12 | 3 | 3 | 12,7 |
| 12 | 3 | 4 | 12,7 |
| 12 | 3 | 5 | 12,7 |
| 12 | 3 | 6 | 12,7 |
| 12 | 3 | 7 | 12,7 |
| 12 | 4 | 1 | 12,7 |
| 12 | 4 | 2 | 12,7 |
| 12 | 4 | 3 | 12,7 |
| 12 | 4 | 4 | 12,7 |
| 12 | 4 | 5 | 12,7 |
| 12 | 4 | 6 | 12,7 |
| 12 | 4 | 7 | 12,7 |

Referencias de planilla:

Bacterias: 1 - *Pectobacterium carotovora* subsp. *atroseptica* (Pca)
4 - *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xv)
5 - *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)
6 - *Agrobacterium tumefaciens* (At)
7 - *Ralstonia solanacearum* (Rs)
8 - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst)
9 - *Pseudomonas corrugata* (Pc)
10 - *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Xcc)
11 - *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss)
12 - *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcci)

Tratamientos: 1 – EEP de Rocha 120 mg.ml⁻¹
2 – EEP de Canelones 120 mg.ml⁻¹
3 – EEP de Rocha 40 mg.ml⁻¹
4 – EEP de Canelones 80 mg.ml⁻¹

- 5 – Testigo etanol 70°
- 6 - EEP de Canelones 40 mg.ml⁻¹
- 7 - EEP de Rocha 80 mg.ml⁻¹