

Efecto nematocida de extractos de ajo, orujo de uva y alperujo de aceituna; sobre *Meloidogyne incognita*, en vid, cv Chardonnay

Nematicidal effects of extracts of garlic, grape pomace and olive mill waste, on *Meloidogyne incognita*, on grapevine cv Chardonnay

Marcelo Diego Martinotti ¹, Sergio Juan Castellanos ^{1,2}, Roxana González ^{3,4}, Alejandra Camargo ^{3,4}, Martin Fanzone ⁵

Originales: *Recepción*: 26/06/2015 - *Aceptación*: 30/12/2015

RESUMEN

Meloidogyne incognita afecta significativamente al cultivo de vid en Argentina. Actualmente se dispone de pocas herramientas para su control. El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de extractos acuosos de bulbillos de ajo, de compost inmaduro de alperujo de aceituna, de compost inmaduro de orujo de uva fresco y de compost inmaduro de orujo de uva agotado, sobre el índice de agallamiento (IA), el índice de reproducción de huevos y juveniles J_2 (IR) y la población final de hembras de *M. incognita* (H), en plantas de vid, cv Chardonnay. La experiencia fue realizada en invernáculo, con plantas en maceta. El único tratamiento que presentó diferencias significativas respecto del control fue el extracto de bulbillos de ajo; mientras que los extractos de compost inmaduro de alperujo de aceituna, de compost inmaduro de orujo de uva fresco y de compost inmaduro de orujo de uva agotado, no afectaron los parámetros evaluados. El extracto de bulbillos de ajo disminuyó un 73% el IA, un 80% el IR y un 94% de H, lo que permite esperar que en el futuro pueda desarrollarse a partir de este material vegetal, un nematocida orgánico y de bajo impacto ambiental.

Palabras clave

protección vegetal • vid • *Meloidogyne incognita* • extracto vegetal • nematocida

-
- 1 Cátedra de Terapéutica Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Alte Brown 500. C. P. M5528AHB. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. mmartinotti@fca.uncu.edu.ar
 - 2 Laboratorio de Nematología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.
 - 3 Laboratorio de Cromatografía para Agroalimentos Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.
 - 4 Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
 - 5 Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales, Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.

ABSTRACT

Meloidogyne incognita, significantly affects the grapevines in Argentina. Currently there are few tools available to control this pest. The objective of this work was to compare the nematicidal effects of aqueous extracts of garlic bulbils, immature compost of olive mill waste, immature compost of fresh grape pomace and immature compost of spent grape pomace on the galling index (IA), the rate of reproduction of the eggs and juveniles J_2 (IR) and the final population of *M. incognita* females (H) in grapevines, cv Chardonnay. The experiments were performed with potted plants of grapevines cv Chardonnay, in greenhouse conditions. The only treatment that showed statistically differences compared to the control, was the extract of garlic bulblets; while the extracts of immature compost of olive mill waste, immature compost of fresh grape pomace and immature compost of spent grape pomace, did not affect the evaluated parameters. The extract of garlic bulblets decreased by 73% the IA, 80% the IR and 94% H, therefore the development from this material of an organic nematicide with low environmental impact could be expected.

Keywords

crop protection • grapevine • *Meloidogyne incognita* • vegetal extracts • nematicide

INTRODUCCIÓN

Las plagas que presentan mayor relevancia en la viticultura argentina son cochinilla harinosa (*Planococcus ficus*) y nematodos (11) a las que se suma desde 2010, polilla de los racimos (*Lobesia botrana*) como plaga cuarentenaria A2 en la Provincia de Mendoza (20). La especie de nematodo con mayor distribución es *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, la cual produce daños que justifican su control. En Argentina, se estima que ocasiona para el cultivo de vid, pérdidas del 15% (11), mientras que a nivel mundial, en la agricultura causa pérdidas del orden de los U\$S100 billones anuales (17) debido al carácter polífago que posee.

Los nematodos fitófagos se encuentran entre las plagas más difíciles de controlar. El desarrollo de nuevos nematicidas es una tarea difícil, debido a que la mayoría de las especies pasan su vida en el suelo o en raíces de las plantas, existiendo una

distancia considerable entre la plaga y el sitio de aplicación de cualquier nematicida.

Por otra parte, la cutícula del nematodo es impermeable a muchas moléculas orgánicas. En consecuencia, la mayoría de los nematicidas han tendido a ser muy tóxicos o volátiles, con una especificidad muy pobre y un elevado riesgo para la seguridad de las personas o el ambiente (7).

El único nematicida registrado para vid en Argentina es el fenamifos (21), un organofosforado sistémico de amplio espectro de acción, neurotóxico que produce la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, con una toxicidad según la Organización Mundial de la Salud (OMS) de clase "Ia" (producto sumamente peligroso) de banda roja, cuyo uso está restringido, debido a los riesgos para la salud humana y el ambiente. A esto se suma que su costo es elevado y presenta importantes restricciones en los mercados consumidores a los cuales Argentina exporta, debido a las bajas tolerancias de los residuos

en uva y en vino. En Argentina su tolerancia es de 0,10 ppm (21) y en la Unión Europea es de 0,03 ppm (16).

Otra estrategia de control de nematodos, es el uso de portainjertos de variedades resistentes, que si bien es eficaz, representa un alto costo al momento de implantación. Al contar con pocas herramientas para el control de esta plaga, se hace necesaria la investigación de alternativas de manejo de nematodos en vid, priorizando aquellas de bajo impacto ambiental.

Entre los antecedentes en el uso de nematocidas de origen natural se puede citar la utilización de enmiendas orgánicas (18), controladores biológicos (12), y de extractos de origen vegetal, como orujo de uva (constituido por los hollejos y pepitas de las bayas de uva, que quedan como residuo luego de la fermentación alcohólica durante el proceso de vinificación), alperujo de aceituna (constituido por agua y restos de carozo del fruto de aceituna, que quedan como residuo luego del proceso de elaboración de aceite) y ajo (7).

D'Addabbo y Sanaselli (1998), demostraron que el orujo de uva fresco (orujo de uva obtenido inmediatamente finalizada la vinificación) tiene un efecto supresivo sobre *M. incognita* en plantas de tomate.

Castellanos y del Toro (2005), evaluaron en plantines de tomate infestados con *M. incognita* en maceta, el efecto nematocida de un extracto acuoso obtenido como resultado del macerado de orujo de uva fresco y un macerado de orujo de uva agotado (obtenido en destilería, luego de la extracción de taninos y alcohol residual usando el orujo fresco como materia prima) en contacto con agua, con dosis equivalente a 20 t/ha.

El mejor tratamiento resultó utilizar orujo de uva fresco, con un índice de

agallamiento de 2,2; un porcentaje de raíces infestadas menor al 25% y con 43,8 J₂ (larvas de 2° estadio) y 9,6 hembras con masas de huevos en 10 gramos de raíces. En segundo lugar, se ubicó fenamifos, con un índice de agallamiento de 2,4; con más del 25% de raíces atacadas y con 74,8 J₂ y 8,4 hembras con masas de huevos, en 10 gramos de raíces.

En tercer lugar, el orujo de uva agotado con un índice de agallamiento 2,6; con un 50% de raíces afectadas, con 787,2 J₂ y 21,6 hembras con masas de huevos.

El testigo tuvo un índice de agallamiento de 4,2; más del 75% de raíces afectadas; 982,8 J₂ y 123 hembras con masas de huevos en 10 gramos de raíz. Rivera y Aballay (2008) obtuvieron en plantas de vid variedad Chardonnay en maceta, la menor tasa de multiplicación (IR) de *M. incognita* con orujo de uva distribuido superficialmente como cobertura, por encima de la tierra (IR=3,4).

En el tratamiento donde el orujo de uva fue incorporado en todo el volumen de tierra como una enmienda, la tasa de multiplicación del nematodo fue mayor (IR=16). Esto se debió a la acción de riegos frecuentes que extraían taninos con acción nematocida del orujo de uva utilizado como cobertura, mientras que cuando el orujo de uva fue incorporado en el suelo, estos compuestos fueron fijados a la materia orgánica y disminuyó su acción sobre la plaga. El testigo presentó un IR=7,7 y el testigo positivo fenamifos un IR=1,1.

Cayuela, M. *et al.* (2008), observaron en bioensayos, con nematodos en cajas de Petri, que extractos acuosos de alperujo de aceituna en diluciones 1:50 (m/v) y 1:10 (m/v) inhibían la eclosión de huevos de *M. incognita* en un 50% y 90% respectivamente, e inmovilizaba a las formas J₂ en un 95%; mientras que

el extracto acuoso de compost maduro y estabilizado de alperujo de aceituna poseía un control muy bajo a cualquiera de las concentraciones ensayadas.

Aleem Khan *et al.* (2011) concluyeron que el extracto acuoso de bulbos de ajo posee actividad nematocida, reduciendo más de ocho veces la presencia de masas de huevos de *M. incognita* en raíces de tomate, respecto del testigo. Martinotti *et al.* (2013), obtuvieron un porcentaje de control del 94,7% sobre *M. incognita* con extracto acuoso de ajo, en condiciones *in vitro*.

Si bien existen trabajos en los cuales se ha evaluado el efecto nematocida de extractos vegetales, al momento no se ha estudiado el efecto nematocida de los extractos acuosos de ajo, alperujo, orujo fresco y orujo agotado sobre *M. incognita* en condiciones *in vivo* en plantas de vid, esta razón es la que motivó la realización del presente trabajo.

El empleo de estos extractos acuosos de origen vegetal, a diferencia del uso de fenamifos, único nematocida con registro para vid en Argentina, no presenta riesgos toxicológicos, ambientales, ni comerciales por la presencia de residuos en vino, por lo que aportarían mayor sustentabilidad al sistema vitivinícola local.

Objetivo

Estudiar el efecto de extractos acuosos de: bulbillos de ajo, de compost inmaduro de alperujo de aceituna, de compost inmaduro de orujo de uva fresco y de compost inmaduro de orujo de uva agotado, en el control de *M. incognita* en plantas de vid, de la variedad Chardonnay cultivada en maceta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las plantas y sustrato libres de nematodos

Se partió de plantas de vid cv Chardonnay, adquiridas en un vivero comercial, de un año de edad, con sanidad certificada por análisis de laboratorio, libres de nematodos y de sustrato esterilizado mediante bromuración, en dosis de 60 g.m⁻², de textura franco arenosa.

Obtención del inóculo de *M. incognita*

Se colectó una masa de huevos de *M. incognita* obtenida de un viñedo infectado. Estos huevos fueron incubados a 28°C por tres días obteniendo las formas juveniles J₂. Estas larvas se multiplicaron en plantas de vid libres de nematodos, obteniendo la cantidad necesaria de nematodos para la experimentación. De estas plantas se obtuvo huevos y larvas que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1%, con el fin de eliminar microorganismos que pudieran afectar su viabilidad.

Finalmente, se utilizó un tamiz de malla n° 325 para lavar las formas infestivas hasta eliminar el hipoclorito de sodio. Todos los huevos y juveniles (J₂) se concentraron en un matraz de 1000 ml.

Para calcular la concentración final de huevos y juveniles J₂, se mantuvo el líquido en agitación constante con la ayuda de una bomba de aire con un caudal de 50 L.hora⁻¹, que a través de un tubo de silicona producía burbujas en la base del recipiente y con una pipeta se extrajeron alícuotas de 1 ml, con 100 formas infestivas (huevos y J₂) (9).

Obtención de extracto acuoso de bulbillos de ajo

Se pesó 250 gramos de bulbillos de ajo morado (*Allium sativum* L. subespecie *pekinense*) y se colocó en un vaso de precipitado, adicionando 1000 mL de agua destilada estéril en relación de dilución 2,5:10 (m/v). Se trituro los bulbillos con mixer picador con cuchillas de doble acción y se filtró por un tamiz de 400 mesh (1). Este proceso se repitió 10 veces acumulando el extracto necesario para el ensayo. Para caracterizar el extracto obtenido, se cuantificó alicina (principal compuesto activo), mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector ultravioleta (HPLC-UV) (3), utilizando una columna de fase reversa ODS C18 (254 mm x 0,46 mm D. I., 5 µm). Como fase móvil se empleó agua: metanol (50:50 v/v), un flujo de 1 mL min⁻¹, loop de 10 µL y el detector se ajustó a una longitud de onda de 245 nm.

Para la identificación y cuantificación se empleó alicina sintetizada en laboratorio mediante la oxidación de dialil disulfuro con agua oxigenada (14). El resultado se muestra en la tabla 1.

Obtención del extracto acuoso de compost inmaduro de alperujo de aceituna

La muestra de alperujo de aceituna, constituida por la fracción acuosa y por los restos sólidos del carozo del fruto de la aceituna, obtenido luego de la molienda de aceitunas en el proceso de extracción de aceite, se dejó secar a temperatura ambiente, realizando controles de humedad y temperatura.

El compost inmaduro obtenido, se molió en molino de martillos hasta obtener partículas de hasta 1 mm, separando luego las partículas mayores con un tamiz y se preparó el extracto acuoso. Para ello, se agregó 1200 g de compost molido a 12000 mL de agua destilada estéril, se dejó macerar durante 2 horas a temperatura ambiente agitándolo en forma permanente y luego se pasó por un papel de filtro (6).

La caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos individuales se realizó por HPLC-DAD siguiendo la metodología descrita por Fanzone (2012).

Tabla 1. Resultados analíticos de la identificación y cuantificación de alicina y polifenoles presentes en los extractos acuosos obtenidos.

Table 1. Analytical result of identification and quantification of alicin and polyphenols contained in aqueous extracts obtained.

Extracto vegetal	Compuestos bioactivos
Bulbillos de ajo	Alicina: 4,00 ± 0,011 ppm.
Compost inmaduro alperujo	Polifenoles totales: 14,56 ppm Los predominantes fueron: los flavonoles dímero y trímero de procianidina (9,80 ppm).
Compost inmaduro orujo uva fresco	Polifenoles totales 17,84 ppm, resultando el flavonol dímero de procianidina con 10,8 ppm, el compuesto predominante.
Compost inmaduro orujo uva agotado	Polifenoles totales 4,02 ppm, entre los cuales predominaron los flavonoles dímero y trímero de procianidina (2,63 ppm).

La separación de compuestos fue realizada en fase reversa mediante una columna C18 Nova-Pak (300 mm x 3,9 mm I.D., 4 mm; Waters Corp., Milford, MA, Estados Unidos) a 25°C. Se empleó un gradiente de dos solventes: A (agua/ácido acético, 98:2, v/v) y B (agua/acetonitrilo/ácido acético, 78:20:2, v/v/v), aplicados con un flujo de 0,9 mL/min desde 0 a 55 min, y de 1 mL/min desde 55 a 125 min; según el siguiente programa: 100-20% A y 0-80% B desde 0 a 55 min, 20-10% A y 80-90% B desde 55 a 57 min, 10% A y 90% B isocrático desde 57 a 70 min, 10-0% A y 90-100% B desde 70 a 80 min, 100% B isocrático desde 80 a 125 min, finalizando con un lavado con metanol durante 5 minutos y posterior restablecimiento de condiciones iniciales hasta equilibrar el sistema.

La detección fue realizada en todo el espectro comprendido entre 210 y 360 nm. La identificación de los compuestos individuales se realizó por comparación de espectros y tiempos de retención con estándares comerciales.

La cuantificación se llevó a cabo por el método del estándar externo con estándares comerciales: [ácido gálico (149-91-7), ácido siríngico (530-57-4), ácido cafeico (331-39-5), ácido p-cumárico (501-98-4), triptofol (526-55-6), (+)-catequina (7295-85-4), (-)-epicatequina (490-46-0), y quercetina-3-glucósido (21637-25-29), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). El tirosol (501-94-0) fue provisto por Fluka (St. Louis, MO, Estados Unidos); mientras que el ácido protocatéquico (99-50-3) fue suministrado por Extrasynthese (Lyon, Francia).

Las curvas de calibración para cada estándar fueron obtenidas por inyección de soluciones patrones, bajo las mismas condiciones que las muestras problema, en el rango comprendido entre 0 y 1,5 g/L ($R^2 \geq 0,94$).

Los compuestos para los cuales no se disponía de estándares comerciales fueron cuantificados con las curvas de quercetina (dihidroflavonoles), quercetina-3-glucósido (glicósidos de quercetina y otros flavonoles), ácido cafeico (ácidos caftarico y cutárico), y (+)-catequina (procianidinas). Todos los análisis fueron realizados por triplicado. El resultado se muestra en la tabla 1 (pág. 215).

Obtención del extracto acuoso de compost inmaduro de orujo de uva fresco

La muestra de orujo de uva fresco, obtenida como subproducto de vinificación en bodega, constituido por los restos sólidos de los hollejos y de las semillas de las bayas de uva, se dejó secar a temperatura ambiente, realizando controles de humedad y temperatura para evitar el ardido.

El compost inmaduro obtenido, se molió con molino de martillos hasta obtener partículas de hasta 1 mm, separando luego las partículas mayores con un tamiz y se preparó el extracto acuoso. Para ello, se agregó 1200 gramos de compost molido a 12000 mL de agua destilada estéril en relación de dilución 1:10 (m/v), se dejó macerar durante 2 horas a temperatura ambiente agitándolo en forma permanente, pasándolo luego por papel de filtro (6).

El extracto obtenido se caracterizó mediante análisis de compuestos fenólicos, siguiendo la metodología descrita en el párrafo precedente. El resultado se muestra en la tabla 1 (pág. 215).

Obtención del extracto acuoso de compost inmaduro de orujo de uva agotado

La muestra de orujo de uva agotado, obtenida como subproducto del proceso industrial de destilación del orujo de uva fresco, para la obtención de alcohol y tanino, se dejó secar a temperatura

ambiente, realizando controles de humedad y temperatura.

El compost inmaduro obtenido, se molió en molino de martillos hasta obtener partículas de hasta 1 mm, separando luego las partículas mayores con un tamiz y se preparó el extracto acuoso. Para ello, se agregó 2400 gramos de compost molido a 12000 mL de agua destilada estéril en relación de dilución 2:10 (m/v), se dejó macerar durante 2 horas a temperatura ambiente agitándolo en forma permanente y luego se pasó por papel de filtro (6). Para caracterizar el extracto obtenido, se identificó compuestos fenólicos como fue descrito anteriormente. El resultado se muestra en la tabla 1 (pág. 215).

Diseño experimental

El experimento se desarrolló en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCUYO, Provincia de Mendoza, Argentina. Se evaluó el efecto nematocida de los cuatro extractos acuosos descritos precedentemente. Los tratamientos fueron comparados con fenamifos CS 24% como testigo químico y un testigo absoluto, en plantas de vid de un año (tabla 2).

Los seis tratamientos fueron inoculados con 1000 formas infectivas (huevos y J₂) de *M. incognita* por planta.

A los 10 días de la inoculación y coincidiendo con el inicio de crecimiento de brotes que en promedio alcanzaban los 10 cm de longitud, se agregó a modo de riego, los extractos vegetales y el fenamifos, a las macetas de cada tratamiento.

Tabla 2. Tratamientos ensayados para evaluar la acción nematocida sobre *Meloidogyne incognita* en plantas de vid, cv Chardonnay, inoculadas con 1000 huevos y juveniles de 2° estadio.

Table 2. Treatment trials to evaluate the nematocide action of *Meloidogyne incognita* in grapevines, cv Chardonnay, inoculated with 1,000 eggs and juveniles of 2nd stage.

Tratamientos		Dosis	Volumen aplicado por maceta	Momentos de aplicación	
				1° aplicación	2° aplicación
T 1	Control (agua)	-	400 mL	Con brotes de 10 cm de largo	15 días después de la 1° aplicación
T 2	Extracto acuoso de bulbillos de ajo	25 g/100 mL agua	400 mL	Con brotes de 10 cm de largo	15 días después de la 1° aplicación
T 3	Fenamifos CS 24%	2000 ppm	400 mL	Con brotes de 10 cm de largo	----
T 4	Extracto acuoso de alperujo de aceituna	10 g/100 mL agua	400 mL	Con brotes de 10 cm de largo	15 días después de la 1° aplicación
T 5	Extracto acuoso de orujo de uva fresco	10 g/100 mL agua	400 mL	Con brotes de 10 cm de largo	15 días después de la 1° aplicación
T 6	Extracto acuoso de orujo de uva agotado	20 g/100 mL agua	400 mL	Con brotes de 10 cm de largo	15 días después de la 1° aplicación

Se repitió las aplicaciones de los extractos vegetales a los 15 días.

El diseño estadístico fue en parcelas completamente el azar con diez repeticiones y se realizó análisis de Varianza con comparaciones de media con el test de LSD Fisher, para un alfa de 0,05. Como unidad de análisis se tomó una maceta de 5 L con una planta de vid. El ensayo finalizó 90 días después de las aplicaciones.

Evaluación del efecto nematicida

Para estudiar el efecto nematicida, se evaluó el Índice de Agallamiento en raíz (IA), el Índice de Reproducción (IR) y la población final de hembras en raíz.

Para evaluar el IA, se extrajo la totalidad del sistema radical de cada planta en cada maceta, se eliminó restos de tierra y se observó la presencia y distribución de agallas en las raíces.

De acuerdo con lo observado, se asignó un IA a cada planta (4). Este índice consta de una escala de 11 rangos (de 0=raíces sin nódulos a 10=todas las raíces con nódulos).

Para la evaluación de los IR y población final de hembras, se extrajo los nematodos del suelo y de las raíces. Para extraer los nematodos del suelo, la muestra se procesó mediante la técnica de flotación y centrifugación (22). Para la extracción de nematodos de las raíces, se procedió a un licuado de la raíz completa, previamente trozada y posterior centrifugación (8); en ambos casos los nematodos se recuperaron en tamiz de 325 mesh y colectados en caja de Petri para su recuento. De las raíces, se extrajo hembras, huevos y larvas. Del suelo se extrajo huevos y larvas J_2 .

El IR es el resultado del cociente entre la población final de huevos y larvas (extraídas de las raíces y del suelo) y la Población inoculada de los mismos al inicio del ensayo.

La población final de hembras es la cantidad de hembras en estado globoso, extraídas de la raíz completa en cada planta.

Los recuentos, tanto de huevos, larvas y hembras, se realizó colectando las muestras procesadas en cajas de Petri, observadas bajo lupa estereoscópica binocular (80X) y con la ayuda de un contador manual.

Se evaluó los datos estadísticamente con análisis de Anova y comparación de medias (Test de LSD Fisher, alfa=0,05). La variable IA se transformó con la función raíz cuadrada, la variable IR por la función logaritmo y la variable Población final de hembras por la función Log (x+1) para cumplir con las condiciones de normalidad y homocedasticidad.

RESULTADOS

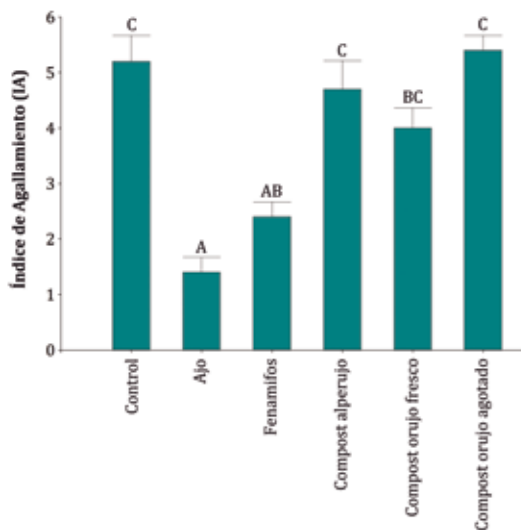
A continuación se presentan los resultados del IA en raíz, IR y de la población Final de hembras. Se presentan los valores promedios obtenidos de las diez repeticiones de cada tratamiento.

Índice de Agallamiento

En la figura 1 (pág. 219), se muestra la media del IA registrado en cada tratamiento al finalizar el ensayo, con el análisis estadístico correspondiente.

El tratamiento con extracto de ajo fue el que presentó un menor IA, con un valor de 1,4, diferenciándose estadísticamente del resto de los tratamientos de extractos vegetales y del tratamiento control. No presentó diferencias estadísticas significativas respecto del tratamiento con fenamifos.

Los tratamientos con extracto de compost inmaduro de orujo fresco, alperujo y orujo agotado, presentaron valores de IA de 4; 4,7 y 5,4 respectivamente, sin diferenciarse estadísticamente entre ellos ni del tratamiento control, que presentó un IA de 5,2.



Tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes.

Treatments with different letters are significantly different.

Figura 1. Índice de Agallamiento (IA) de *Meloidogyne incognita* en raíces de plantas de vid cv. Chardonnay inoculadas con 1000 huevos y larvas de 2° estadio, tratadas con distintos extractos vegetales, evaluado a los 90 días de las aplicaciones (media y error estándar). Test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$). DMS=0,30290.

Figure 1. Gall index (AI) of *Meloidogyne incognita* in roots of grape plants cv. Chardonnay inoculated with 1000 eggs and larvae of 2nd stage, treated with different plant extracts, evaluated at 90 days of application (average and standard error). Test de LSD Fisher ($p \leq 0.05$). DMS=0.30290.

Índice de Reproducción

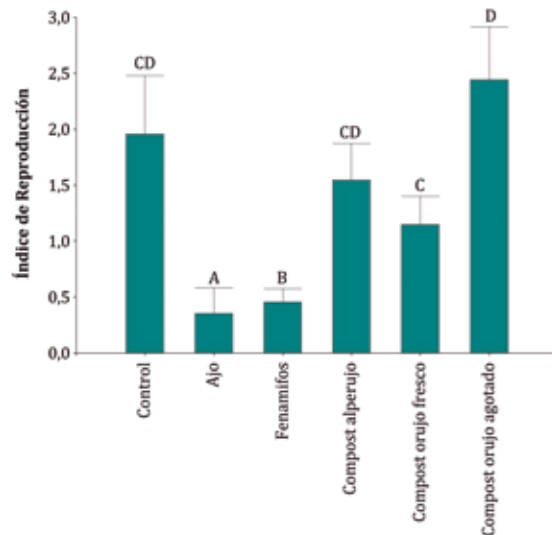
En la figura 2 (pág. 220), se muestra el IR registrado en cada tratamiento y el análisis estadístico respectivo.

Los únicos tratamientos que presentaron una disminución de la población, fueron los tratamientos con extracto de ajo y con fenamifos. El resto de los tratamientos presentaron una población final de formas juveniles, mayor a la inicialmente inoculada.

El tratamiento con extracto de ajo fue el que menor IR mostró, con un valor de 0,35; diferenciándose estadísticamente del resto de los tratamientos, incluso del tratamiento con el nematocida fenamifos (IR=0,45).

Los tratamientos con extracto de compost inmaduro de orujo de uva fresco, alperujo y orujo de uva agotado, registraron valores de IR de 1,15; 1,55 y 2,44 respectivamente, sin diferenciarse estadísticamente del tratamiento control, que presentó un IR de 1,95.

El tratamiento con extracto de compost de orujo de uva fresco se diferenció del tratamiento con extracto de compost de orujo de uva agotado, que presentó el mayor IR.



Tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes.

Treatments with different letters are significantly different.

Figura 2. Índice de Reproducción (población final/población inicial de huevos y larvas de 2° estadio de *Meloidogyne incognita*) en plantas de vid cv. Chardonnay, inoculadas con 1000 huevos y larvas de 2° estadio, tratadas con distintos extractos vegetales, evaluado a los 90 días de las aplicaciones (media y error estándar). Test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$). DMS=0,12187.

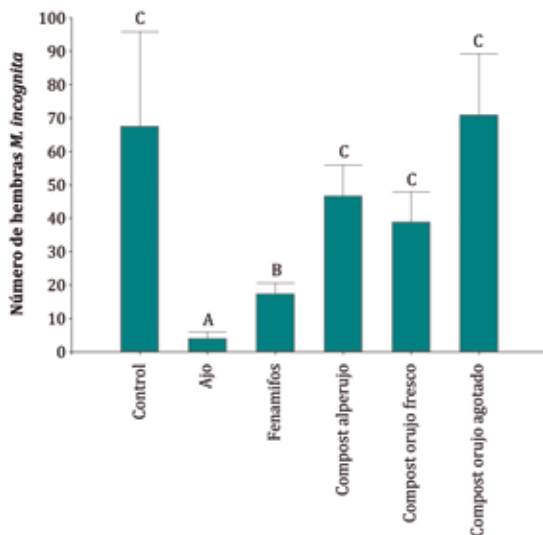
Figure 2. Reproduction Index (final population / initial population of eggs and larvae of 2nd stage of *Meloidogyne incognita*) in vines cv. Chardonnay, inoculated with 1,000 eggs and larvae of 2nd stage, treated with different plant extracts, evaluated at 90 days of application (average and standard error). Test de LSD Fisher ($p \leq 0.05$). DMS=0.12187.

Población final de hembras en raíz

En la figura 3 (pág. 221), se muestra la población final de hembras globosas registrada en cada tratamiento y el análisis estadístico respectivo.

El tratamiento con extracto de ajo fue el que menor cantidad de hembras presentó, con un valor de 4 hembras por raíz completa, diferenciándose estadísticamente del resto de los tratamientos, incluso del tratamiento con el nematicida fenamifos, el cual mostró 17 hembras.

Los tratamientos con extracto de compost inmaduro de orujo de uva fresco, alperujo y orujo de uva agotado, presentaron valores de 39; 47 y 71 hembras respectivamente, sin diferenciarse estadísticamente entre ellos ni del tratamiento control, el cual registró 68 hembras en raíz.



Tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes.

Treatments with different letters are significantly different.

Figura 3. Población final de hembras globosas de *Meloidogyne incognita* en raíz de plantas de vid cv. Chardonnay inoculadas con 1000 huevos y larvas de 2° estadio, tratadas con distintos extractos vegetales, evaluado a los 90 días de las aplicaciones (media y error estándar). Test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$). DMS=0,29189.

Figure 3. Final population of spherical females of *Meloidogyne incognita* in root vine plants cv Chardonnay inoculated with 1000 eggs and larvae of 2nd stage, treated with different plant extracts evaluated at 90 days of application (average and standard error). Test de LSD Fisher ($p \leq 0.05$). DMS=0.29189.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, son coincidentes con los obtenidos por Aleen Khan S. *et al.* (2) respecto del efecto del extracto de ajo sobre hembras de *M. incognita*, quienes observaron en plantas de tomate una disminución del 67% respecto del testigo, mientras que en este trabajo se observó una reducción de las hembras en torno al 94% en plantas de vid.

Y también son coincidentes estos resultados con los de Martinotti *et al.* (2013) respecto del efecto nematocida del extracto acuoso de bulbillos de ajo

sobre *M. incognita*, quienes observaron en condiciones *in vitro* un 95% de mortandad de larvas J_2 . El experimento que aquí se presenta es la primera cita del efecto nematocida de este extracto sobre *M. incognita* en raíces de *vitis vinifera*, en condiciones *in vivo* y con la identificación y cuantificación de alicina como posible principio activo responsable de esta acción.

El efecto de los extractos de orujo de uva fresco y agotado, presentó coincidencias parciales respecto de lo informado por otros investigadores.

Al igual que Rivera y Aballay (2008), el uso de extracto de orujo de uva fresco disminuyó la tasa de multiplicación (IR) de *M. incognita* aproximadamente un 50% respecto del testigo, en plantas de vid. En este caso, esa diferencia no fue estadísticamente significativa. También se presentan coincidencias con lo observado por Castellanos S. *et al.* (2005) en plantas de tomate, en cuanto a que el extracto de orujo de uva fresco presentó mayor acción sobre *M. incognita* que el extracto de orujo de uva agotado en los parámetros evaluados. Estos autores, obtuvieron con orujo de uva fresco un IA de 2,2; un porcentaje de raíces infestadas menor al 25%; 43,8 J₂ y 9,6 hembras con masas de huevos, en 10 gramos de raíces, mientras que con el extracto de orujo de uva agotado obtuvieron mayores valores de IA (2,6); porcentaje de raíces afectadas (50%), y juveniles y hembras con masas de huevos en 10 gramos de raíces (787,2 y 21,6 respectivamente).

Esta experimentación, el extracto de orujo de uva fresco, obtuvo también mejores resultados que el extracto de orujo de uva agotado, con un IA de 4, un IR de 1,1 y 38,8 hembras globosas por planta en raíz, mientras que con el extracto de orujo agotado estos parámetros fueron mayores, 5,4 (IA), 2,4 (IR) y 70,9 (hembras globosas por planta en raíz). Esta diferencia en la respuesta a los distintos tipos de orujos, pudo deberse a la mayor concentración de polifenoles presentes en el extracto de orujo de uva fresco, tal como se determinó analíticamente (tabla 1, pág. 215).

Por otro lado, una diferencia entre ambos trabajos, fue que en este caso, el efecto observado del extracto de orujo de uva fresco y del extracto de orujo de uva agotado, no se diferenció estadísticamente del tratamiento testigo (control).

Una diferencia metodológica entre ambos trabajos fue que, mientras Castellanos *et al.* (2005) utilizaron orujos de uva sin compostar, en esta investigación se utilizó orujos de uva semi compostado para obtener los extractos. Es posible que las transformaciones que sufrieron los compuestos durante el proceso de compostaje, resulten en una disminución en la concentración y en una pérdida de su acción nematocida. Esta pérdida de acción nematocida también la obtienen Cayuela M. *et al.* (2008), quienes compararon la acción nematocida de un extracto acuoso de alperujo de aceituna sin compostar, con un contenido de 1,3 g.L⁻¹ de polifenoles totales, con un extracto acuoso de compost maduro, de la misma fuente agroindustrial, con 0,19 g.L⁻¹ de polifenoles totales.

Con respecto al extracto de compost de alperujo de aceituna, no se observó el mismo efecto inhibitorio sobre *M. incognita* que informaron Cayuela M. *et al.* (2008) en condiciones *in vitro*. Esto pudo deberse a que en el extracto, se detectó 14,5 ppm de polifenoles totales, de los cuales 9,8 ppm corresponden a flavonoles de procianidina, mientras que el extracto acuoso obtenido por Cayuela M. *et al.* (2008), contenía una concentración 90 veces mayor de polifenoles totales, de 1,3 g.L⁻¹ (1300 ppm).

También Chitwood D. (2002) mencionó que la concentración de polifenoles totales con efectos tóxicos sobre *M. incognita* es de 1100 µg/ml (1100 ppm), y que compuestos fenólicos como los ácidos vanillico, cafeico, syringico, y o-coumárico, son activos a 15 µg/ml (15 ppm).

Por lo expuesto, la falta de acción nematocida que presentaron los extractos de alperujo de aceituna y orujos de uva aquí ensayados, pudo deberse a la baja concentración obtenida de compuestos con actividad tóxica sobre *M. incognita*.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones del presente experimento, el extracto acuoso de bulbillos de ajo, con un contenido de 4 ppm de alicina, presenta acción nematocida sobre *M. incognita* en plantas de vid, cv Chardonnay, en condiciones de cultivo en maceta. Disminuye el Índice de Agallamiento, el Índice de Reproducción de formas juveniles (huevos y J₂), y la población final de hembras de *M. incognita* en raíces de plantas de vid.

Los extractos acuosos de compost inmaduro de alperujo de aceituna, compost inmaduro de orujo de uva fresco y compost inmaduro de orujo de uva agotado, con contenidos de polifenoles

totales de 14 ppm, 17 ppm y 4 ppm respectivamente, no disminuyen el Índice de Agallamiento ni el Índice de Reproducción de *M. incognita* en raíces de plantas de vid.

El efecto nematocida del extracto acuoso de bulbillos de ajo, permite esperar que en el futuro pueda desarrollarse a partir de este material vegetal, un nematocida orgánico, de bajo impacto ambiental y fácilmente disponible en nuestro medio, que reemplace el uso de nematocidas de síntesis, neurotóxicos, de elevada toxicidad y de amplio espectro, confiriéndole al sector vitivinícola mayor sustentabilidad económica, social y ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agbenin, N. O.; Emechebe, A. M.; Marley, P. S.; Akpa, A. D. 2005. Evaluation of nematocidal action of some botanicals on *Meloidogyne incognita* *in vivo* and *in vitro*. Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics. 106(1):29-39.
2. Aleem Khan, S.; Javed, N.; Khan, M. A.; Haq, I. U.; Safdar, A. 2011. Use of plant extracts as bare dip root treatment for the management of *Meloidogyne incognita*. Pakistan Journal of Phytopathology. 23(1): 09-13.
3. Baghalian, K.; Ziai, S.; Naghavi, M.; Badi, H.; Khalighi, A. 2005. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. Scientia Horticulturae. 103: 155-166
4. Bridge, J.; Page, S. L. J. 1980. Estimation of Root-knot Nematode Infestation levels on roots using a rating chart. Tropical Pest Management. 26(3): 296-298.
5. Castellanos, S. J.; del Toro, M. 2005. Comparación de dos enmiendas de suelo a base de orujo de uva en el control de *Meloidogyne incognita* en tomate bajo condiciones de invernáculo. Nematropica. 35(2): 85-86.
6. Cayuela, M.; Millner, P.; Meyer S.; Roig A. 2008. Potential of olive mill waste and compost as biobased pesticides against weeds, fungi, and nematodes. Science of the Total Environment. 399: 11-18.
7. Chitwood, D. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review Phytopathology. 40: 221-49.
8. Coyne, D. L.; Nicol, J. M.; Claudius-Cole, B. 2007. Practical plant nematology: a field and laboratory guide. Ed. SP-IMP Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Cotonou. Benin.
9. Cristóbal, A. J.; Del Prado, V.; Marbán Mendoza, G. P.; Sánchez, G.; Mora-Aguilera; Manzanilla, L. 2001. Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. Nematropica. 31(2):229-235.
10. D' Addabbo, T.; Sanaselli, N. 1998. The suppression of *Meloidogyne incognita* on tomato by grape pomace soil amendments. Nematology Mediterranea. 26: 145-149.

11. del Toro, M. S.; Castellanos, S. J.; Larriqueta, J. E.; Martinotti, M. D. 2009. Manejo de Nematodos en Viñedos. En: II^o Encuentro Ítalo Argentino sobre la producción integrada de los cultivos: vides y vinos. Ed. UNC, UNCUYO e IIC, Mendoza, Argentina. 177-200.
12. Del Valle, E. E.; Doucet, M. E. 2014. Effects of *Galleria mellonella* cadavers infected with *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema rarum*, their macerates and dead infective juveniles on *Meloidogyne javanica* suppression. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza. Argentina. 46(1): 205-211.
13. Fanzone, M. 2012. Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.): su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial. Tesis Doctoral. Universidad Rovira I Virgili. Tarragona, España. URL <http://www.tdx.cat>
14. González, R., Camargo, A.; Burba, J. 2007. Obtención de un estándar secundario de cuantificación para la síntesis y purificación de allicina. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 39(2): 61-70.
15. Martinotti, M. D.; Castellanos S. J.; del Toro, M. S. 2013. Susceptibilidad *in vitro* de *Meloidogyne incognita* a extractos acuosos de material vegetal. Nematropica. 43(2): 309-310.
16. Official Journal of the European Union. 2011. Commission Regulation (UE) N^o 559/2011. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1434133164511&uri=CELEX:32011R0559> (fecha de consulta: 10/03/2014).
17. Oka, Y.; Nacar, S.; Putievsky, E.; Ravid, U.; Yaniv, Z.; Spiegel, Y. 2000. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. Pest Management Science. 56: 983-988.
18. Renčo, M. 2013. Organic amendments of soil as useful tools of plant parasitic nematodes control. Helminthologia. 50(1): 3-14.
19. Rivera L.; Aballay E. 2008. Nematicide effect of various organic soil amendments on *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968, on potted vine plants. Chilean Journal of Agricultural Research. 68(3): 290-296.
20. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Resolución 122/2010. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1447&io=12300> (fecha de consulta: 10/04/2014).
21. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Resolución 934/2010. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1501&ino=1501&io=15900> (fecha de consulta: 21/04/2014).
22. Zuckerman, B. M.; Mai, W. F.; Harrison, M. B. 1985. En: Fitonematología Manual de laboratorio. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.

AGRADECIMIENTOS

A todos los integrantes de la cátedra de Terapéutica Vegetal de la FCA-UNCuyo.
A Jorge E. Perez Peña, Coordinador de Investigación de la EEA INTA Mendoza .