

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica del extracto de *Heliopsis longipes* en cepas de *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum*

Juan Carlos Delgado Ortiz¹
Yisa María Ochoa Fuentes^{1§}
Mariana Beltrán-Beache¹
Ernesto Cerna Chávez¹

¹Departamento de Parasitología Agrícola-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. Tel. 01(844) 4110326. Fax. 01 (844) 4110226. (moe_788@hotmail.com; yisa8a@yahoo.com; beltranmariana89@gmail.com).

§Autor para correspondencia: yisa8a@yahoo.com.

Resumen

La pudrición blanca y la pudrición blanda causadas por *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum* son la principal causa de pérdidas en cultivos de ajo y lechuga, dificultándose su control debido a la producción de esclerocios. Una alternativa amigable con el medio ambiente para el control de enfermedades, es el uso de extractos de plantas; como *Heliopsis longipes*, la cual tiene la capacidad de producir alcaloides como la afinina, las cuales son responsable de su efecto como insecticida y bactericida, cabe mencionar que este compuesto se encuentra en mayor proporción en las raíces de la planta. Por lo cual la recolecta del material biológico se realizó en Guanajuato en el año de 2013, del cual se aisló el hongo y en el cual se evaluó la actividad antifúngica del extracto y se verificó la viabilidad de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum*, mediante la técnica de medio envenenado. Lográndose obtener porcentajes de inhibición superiores a 75% para las cepas de *Sclerotium cepivorum*, mientras que para *Sclerotinia sclerotiorum* inferiores a 40%. Además de mostrar reducción estadísticamente significativa en la producción de esclerocios y solo afectar el vigor de crecimiento en una de las cepas evaluadas. Por lo cual el extracto mostró ser efectivo en el control en los parámetros evaluados.

Palabras claves: *Heliopsis longipes*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, viabilidad de los esclerocios.

Recibido: mayo de 2018

Aceptado: junio de 2018

Introducción

Las enfermedades de raíz son las principales causas de pérdidas económicas en cebolla y cultivos relacionados, a través de todo el mundo. La pudrición blanca causada por *Sclerotium cepivorum* Berk es una de las más importantes enfermedades de raíz. El desarrollo de la enfermedad ocurre en diferentes regiones alrededor del mundo donde las condiciones ambientales son favorables para el patógeno (Velázquez-Valle y Medina-Aguilar, 2004). En México, esta es la principal causa de pérdidas de rendimiento y calidad en ajos (Delgadillo *et al.*, 2004), lo que ha llegado a ocasionar pérdidas totales en la región del Bajío (Pérez-Moreno *et al.*, 2009), dificultándose su control debido a los esclerocios, estructuras reproductivas del hongo, las cuales pueden permanecer viables hasta por 20 años (Delgadillo *et al.*, 2004).

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary es el agente causal del moho blanco o pudrición blanda, el cual a llegado a ocasionar pérdidas de hasta 70% en el cultivo de la lechuga. Los síntomas en esta se manifiestan en la fase final del ciclo del cultivo, mostrando marchitez de las hojas externas de la planta, con la presencia de crecimiento micelial blanco algodonoso hacia la parte basal o central del tallo, a partir del cual se forman cuerpos compactos denominados esclerocios (Arias *et al.*, 2007).

Una alternativa amigable con el medio ambiente para el control de enfermedades, es el uso de extractos de plantas (González *et al.*, 2011). Los metabolitos secundarios vegetales o compuestos bioactivos con propiedades fungicidas son una opción en el manejo de patógenos, ya que actúan contra un número limitado de especies, son biodegradables a productos no tóxicos, tienen bajo impacto en la salud humana y pueden ser incorporados a los programas de manejo integrado de plagas y enfermedades (Salgado-Galciglia *et al.*, 2008).

Algunos géneros de la tribu *Heliantheae* producen diferentes tipos de alcanidas, estos compuestos son amidas o ésteres hidrofóbicos que contienen ácidos grasos insaturados como parte de su estructura química (García *et al.*, 2004).

Heliopsis longipes es miembro de la familia *Asteraceae*, presenta diferentes compuestos como la afinina, perteneciente al grupo de las alcanidas (Molina *et al.*, 1995; García *et al.*, 2004). La afinina es la alcanida que se encuentra en mayor proporción en las raíces de esta planta y principal responsable de los efectos biológicos como la actividad insecticida y bactericida; este compuesto tiene acción biocida sobre algunas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como en algunos hongos de la clase Ascomycetes (Molina *et al.*, 1995; García *et al.*, 2004; Montes-Belmont y Prado-Ligero, 2006; Salgado-Galciglia *et al.*, 2008). El objetivo de este trabajo, fue evaluar la actividad antifúngica del extracto crudo de *H. longipes* en cepas de *S. cepivorum* y *S. sclerotiorum* y la viabilidad de los esclerocios posteriormente a la aplicación del extracto.

Metodología

La investigación se realizó en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el laboratorio de Toxicología.

Muestras

Las muestras fueron colectadas durante 2013 en Comonfort (PBGTO7) y Cortazar (PBGTO52 y PBGTO61) en Guanajuato, México, en ajo donde se extrajeron plantas que presentaron la siguiente sintomatología: amarillamiento inicial en las hojas basales, marchitamiento, necrosis del follaje y abundante presencia de esclerocios en los bulbos de las plantas muertas. Las dos cepas de *S. sclerotiorum* (MBREP y MBLEC) aisladas de cultivos de repollo y de lechuga respectivamente; y la cepa PBZAC de *S. cepivorum* procedentes de cultivos de ajo del estado de Zacatecas, México, fueron proporcionadas por la Bióloga María Mercedes Medina Aguilar.

Obtención de esclerocios

Se extrajeron 10 esclerocios directamente de las plantas de ajo con un microscopio estereoscópico y agujas de disección, posteriormente fueron colocados en cajas Petri para su desinfección.

Cultivo del hongo

Para la obtención de cepas puras, los esclerocios fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio 3% durante tres min, se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril y fueron sembrados en cajas de Petri con medio sólido de Papa Dextrosa Agar (PDA) e incubados en oscuridad a 25 ± 2 °C durante tres días.

Pruebas de diferenciación para *Sclerotium* spp.

Para la identificación de la especie de los aislados de *Sclerotium* se desarrolló la metodología empleada por Montes *et al.* (2003), en la cual discos de micelio de los diferentes aislados de *Sclerotium* fueron inoculados en cinco frutos maduros de jitomate (5 discos/fruto), con la finalidad de diferenciar las especies que atacan a la cebolla *S. cepivorum* la cual afecta únicamente al género *Allium* y *S. rolfsii* que ataca una gran variedad de especies.

Evaluación del extracto

Para determinar la concentración mínima inhibitoria se emplearon cinco concentraciones 5 000, 10 000, 15 000 y 25 000 ppm, en base a la concentración de afinina presente en el extracto (70 800 ppm), el cual fue agregado al medio papa dextrosa agar (PDA) estéril antes del vaciado en las placas, cuando se encontraba a una temperatura de 55 °C. De cada uno de los aislamientos de *S. cepivorum* y *S. sclerotiorum*, se tomaron discos de micelio de 1 cm de diámetro donde el hongo se encontraba cubriendo 80% la superficie del disco, cada uno fue colocado en el centro de las cajas con medio envenenado. Las cajas fueron incubadas a 25 ± 2 °C y se midió el crecimiento radial del micelio cada 24 h hasta que el testigo cubrió la superficie del medio de cultivo. Con los porcentajes de inhibición se determinó la dosis efectiva media con análisis PROBIT del programa SAS 9.1.

Número de esclerocios producidos en el bioensayo y vigor de crecimiento del hongo.

Se obtuvo un promedio de los esclerocios producidos en las cajas Petri con el extracto, contando los esclerocios que se originaron en cada caja Petri después de la confrontación con el extracto, en cada una de las cuatro repeticiones de cada tratamiento.

El vigor de crecimiento del hongo se determinó 14 días después de la siembra, se tomó una muestra de 10 esclerocios, utilizando la escala propuesta por el Horticultural Research International de Wellesbourne, en el Reino Unido (Ramírez *et al.*, 2000) donde: 0= esclerocio sin crecimiento; 1= Esclerocio con primeras hifas; 2= esclerocio con hifas en 25% del círculo de agar; 3= esclerocio con hifas en 50% del círculo de agar; 4= esclerocio con hifas en 100% del círculo de agar; 5= formación de esclerocios blancos en el círculo de agar; 6= formación de esclerocios café en el círculo de agar. El vigor de crecimiento del hongo se obtuvo con el promedio de los valores en las cuatro repeticiones. El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar. Se realizó un Anova y pruebas de comparación de medias.

Resultados

Los aislados de *Sclerotium* presentaron micelio blanco, esclerocios blancos que se fueron tornando de color café oscuro a negro. La prueba de patogenicidad para diferenciar las especies de *Sclerotium* fueron (negativas) en los frutos de jitomate, lo que nos indica que las cepas pertenecen a la especie *S. cepivorum* de acuerdo a la metodología de Montes *et al.* (2003).

Los resultados nos arrojan un porcentaje de inhibición superior al 50% a la concentración de 15 000 ppm a excepción de la cepa procedente de Zacatecas y las cepas de *S. sclerotiorum*, siendo la cepa PBGTO61 la que se mostró el mayor porcentaje de inhibición a las 25 000 ppm con un porcentaje de 77.01%. Mientras que las cepas de *S. sclerotiorum* (MBREP y MBLEC) mostraron los porcentajes de inhibición más bajos 39.58 y 25.09% en la concentración de 25 000 ppm, cabe mencionar, que las cepas de *S. cepivorum* mostraron una tasa de crecimiento menor a las cepas de *S. sclerotiorum* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Inhibición del crecimiento micelial por el extracto de *H. longipes*.

CONC. (PPM)	PBGTO7* (%)	PBGTO52* (%)	PBGTO61* (%)	PBZAC* (%)	MBREP** (%)	MBLEC** (%)
5 000	5.44	1.47	8.29	23.76	4.38	3.03
10 000	31.46	19.79	29.49	47.87	10.33	7.05
15 000	70.21	63.99	71.26	58.42	26.19	15.99
25 000	75.44	72.72	77.01	68.14	39.58	25.09

*= porcentajes de inhibición a las 144 h. **= porcentajes de inhibición a las 72 h.

Ramírez *et al.* (2008) evaluaron el efecto del extracto crudo de *H. longipes* sobre el desarrollo del micelio en base a peso seco en las especies de *S. cepivorum* y *S. rolfsii*, obteniendo una disminución del peso seco de 90% y 80% respectivamente a concentraciones de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cabe mencionar que el porcentaje de inhibición más alto obtenido en este trabajo fue de 77.01% a 25 000 ppm de la cepa PBGTO61. Adicionalmente reportan la dosis letal media de la afinina y del extracto crudo para *S. rolfsii* varió entre 15 y 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que para *S. cepivorum* osciló entre 5 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En el Cuadro 2, muestra la dosis efectiva media para cada una de las cepas empleadas en este trabajo y sus límites fiduciales.

Asimismo, Ramírez *et al.* (2008) evaluaron el contenido de ergosterol en los aislados al ser expuestos a la afinina y al extracto crudo, presentándose reducciones del ergosterol en las dos especies y en las dos presentaciones (extracto crudo de raíz y afinina purificada), enunciando que

la inhibición del ergosterol no es específica por lo que es paralela con el peso seco del micelio, lo cual pudiera ser tomado como un índice de crecimiento. Mientras que Pérez-Moreno *et al.* (2000) expone que el uso de productos químicos como tebucanzole para el control de aislados de *S. rolfsii* los cuales fueron colectados en 2003, no han desarrollado la resistencia al modo de acción de este tipo de productos; sin embargo, puede ser posible que el uso de este producto esté afectando el efecto de otros compuestos como es el caso de la afinina.

Cuadro 2. Dosis efectiva media (ED₅₀) sobre el crecimiento micelial de *S. cepivorum* y *S. sclerotiorum*.

CEPA	ED ₅₀	Limites fiduciales 95 (%)	Limites fiduciales 95 (%)
PBGTO7	13 259	2 788	12 7976
PBGTO52	6 533	5 709	8 053
PBGTO61	12 951	3 326	75 446
PBZAC	10 891	5 873	16 293
MBREP	32 326	25 625	48 020
MBLEC	57 900	37 555	154 043

En el Cuadro 3, se puede observar como en las seis cepas hay una tendencia a la disminución de la producción de esclerocios conforme las concentraciones del extracto van en aumento en el medio de cultivo, mostrando diferencia significativa en todas las cepas en la producción de esclerocios, siendo PBZAC la única cepa en no mostrar diferencia en la producción de esclerocios.

Cuadro 3. Producción de esclerocios.

CONC. PPM	Numero de esclerocios					
	PBGTO7	PBGTO52	PBGTO61	PBZAC	MBREP	MBLEC
Test	2445.5 a	2352 a	2331.5 a	2318.5 a	33.25 a	38 a
5 000	2187.3 a	1862.3 ab	1923.8 ab	2011.5 a	39.5 a	31 ab
10 000	1013.8 b	1481.8 ab	1848 ab	1527.5 a	29.5 ab	22.5 ab
15 000	1352.8 b	727.5 b	1790.5 ab	1457 a	27.25 ab	19.75 b
25 000	1204.3 b	694 b	1408.3 b	1385.5 a	18 b	17.75 b

Valores con la misma letra en la misma columna son estadísticamente iguales (LDS, $p > 0.01$).

Estos resultados coinciden con los reportados por Ochoa *et al.* (2012a) en la evaluación antifúngica de cuatro extractos vegetales (tabaquillo, canela, pirul y chirimoya) en el control de tres especies de *Fusarium*, de los cuales los extractos de pirul y tabaquillo mostraron un incremento en la producción de conidias. Al igual que Montes y Prado (2006) quienes reportan el incremento en la producción de esclerocios de *S. cepivorum* al ser expuestos a cuatro extractos (perejil, alfalfa, pimienta negra y mejorana) de los 15 extractos evaluados; mostrando incrementos de 296.41%, 192.67%, 140.6% y 117.35%.

El vigor de crecimiento *in vitro* de los esclerocios no mostró diferencia significativa entre los tratamientos en las cepas PBGTO7, PBGTO52, PBGTO61, PBZAC y MBREP (Cuadro 4). Mientras que en la cepa MBLEC se redujo a 4.75 en la concentración de 25 000 ppm; cabe mencionar, que la ED₅₀ calculada para esta cepa es superior (57 900 ppm).

Cuadro 4. Vigor de crecimiento de los esclerocios *in vitro*.

CONC. PPM	Cepas					
	PBGTO7*	PBGTO52*	PBGTO61*	PBZAC*	MBREP*	MBLEC*
Test	5.5 a	4.5 a	4.5 a	5.5 a	6 a	6 a
5 000	5.25 a	4.5 a	4.5 a	5.25 a	6 a	5 ab
10 000	5.5 a	4.25 a	4.25 a	5.25 a	5.5 a	6 a
15 000	5 a	4.25 a	4 a	5.25 a	5.5 a	5.25 ab
25 000	5 a	4 a	4 a	5 a	5 a	4.75 b

Valores con la misma letra en la misma columna son estadísticamente iguales (LDS, $p > 0.05$)

Pérez-Moreno *et al.* (2009) evaluaron la capacidad de cinco fungicidas para inhibir el crecimiento, la producción de esclerocios, la viabilidad y el vigor de crecimiento, siendo Tebuconazole y TCMTB, los que presentaron el menor vigor de crecimiento (sin crecimiento), mientras que Procimidone, Thiabendazole y Iprodione mostró un vigor de crecimiento de 4.87, 5.58 y 5.73 respectivamente. Cabe mencionar, que en la cepa PBGTO52, PBGTO61 y MBLEC presentaron un vigor de crecimiento inferior a los reportado por Pérez-Moreno *et al.* (2009) para los productos Procimidone, Thiabendazole y Iprodione.

Conclusiones

El extracto de *H. longipes* mostró efecto sobre el crecimiento micelial, redujo el número de esclerocios y el vigor de crecimiento solo se vio afectado en una de las cepas empleadas en este estudio.

Literatura citada

- Arias, L. A.; Tautiva, L. A.; Piedrahíta, W. y Chaves, B. 2007. Evaluación de tres métodos de control del Moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en lechuga (*Lactuca sativa* L.) Colombia. Agron. Colomb. 25(1):131-141.
- Delgadillo, S. F.; Zavaleta, M. E.; Aguilar, L. A.; Arévalo, V. A.; Torres, P. I.; Valdivia, A. R. y Garzón, T. J. 2004. Manejo de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) del ajo en Guanajuato, México. Agric. Téc. Méx. 30(01):41-52.
- García, C. A.; Ramírez C. E.; Molina T. J. 2004, El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcamidas presentes en sus raíces. México. Acta Bot. Mex. 69(1):115-131.
- González, M. S.; Flores, L. M.; Benavides, M. A. y Flores, O. A. 2011. Actividad inhibitoria del extracto de *Heliopsis longipes* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*. Mexico. Rev. Mex. Fitopatol. 29(2):146-153.

- Molina, T. G.; Salgado, G. R. and Ramírez, C. E. 1995. Presence of the bornyl ester of deca-2*E*-6*Z*-8*E*-trienoic acid in *Heliopsis longipes*. J. Natural Produc. 58(10):1590-1591.
- Montes, B. R. y Prado, L. A. M. 2006. Influence of plant extracts on *Sclerotium cepivorum* Development. Asia. Plant Pathol. J. 5(3):373-377.
- Montes, B. R.; Nava, J. R. A.; Flores, M. H. E. y Mundo, O. M. 2003. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el estado de Morelos, México. Rev. Mex. Fitopatol. 21(03):300-304.
- Pérez, M. L.; Rodríguez, A. A. y Sánchez, P. J. 2004. Efecto de *Coniothyrium minitans* Cambell en esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. México. Rev. Mex. Fitopatol. 22(003):429-434.
- Pérez, M. L.; Villalpando, M. J. J.; Castañeda, C. C. y Ramírez, M. R. 2009. Sensibilidad *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* Saccardo, a los fungicidas comúnmente usados para su combate. México. Rev. Mex. Fitopatol. 27(1):11-17.
- Ramírez, C. E.; Lucas, V. L.; Virgen, C. G. y Molina, T. J. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. México. Agrociencia. 34(2):207-215.
- Salgado, G. R.; Molina, T. J.; López, M. J. E. y Loeza, L. P. 2008. Efecto del extracto crudo y los compuestos bioactivos de *Heliopsis longipes* sobre la incidencia de la antracnosis, micorrización y nodulación del frijol. México. Agrociencia. 42(6):679-688.
- Schwartz, H. F. and Mohan, S. 2008. Compendium de onion and garlic disease. Amerinac Phytopathological Society (APS). St. Paul. Minnesota. 127 p.
- Velázquez, V. R. y Medina, A. M. 2004. Persistencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk en suelos infestados de Aguascalientes y Zacatecas, México. México. Rev. Mex. Fitopatol. 22(001):143-146.
- Ochoa, F. Y. M.; Cerna, C. H. E.; Gallegos, M. G.; Landeros, F. J.; Hernández, C. S. y Delgado, O. J. C. 2012. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. Argentina. Pyton. 81(1):69-73.