

Evaluación *in vitro* del Efecto Inhibidor de Extractos Fermentados (Purines) de Chipaca (*Bidens pilosa*) sobre el Crecimiento de *Phytophthora infestans*

Evaluation of in vitro inhibitory effect of fermented extracts (Purines) of Chipaca (Bidens pilosa) on the growth of Phytophthora infestans

CASTELLANOS, Diana Edith, Universidad Nacional de Colombia, castellanosdiana@hotmail.com; ENRIQUEZ, Andrea, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, andremow@yahoo.com.mx; DIAZ, Leidy Johana, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, leidyya86@gmail.com; LEÓN, Tomás Enrique, Universidad Nacional de Colombia, teleons@unal.edu.co

Resumen

Phytophthora infestans es el fitopatógeno responsable del tizón tardío en cultivos de papa (*Solanum* spp). El control de este hongo genera altos costos económicos por el uso de fungicidas químicos, que a su vez causan serios daños ambientales por su alta residualidad, siendo altamente tóxicos para la salud de los consumidores. En este estudio, presentamos resultados de la evaluación del efecto inhibidor de diferentes purines o extractos fermentados de Chipaca (*Bidens pilosa*) frente al crecimiento de *P. infestans* en placas de medio de cultivo. Se evaluaron cuatro purines compuestos por hojas y tallos, raíces, flores y finalmente la mezcla total del tejido vegetal de *B. pilosa*, empleando la técnica del cilindro o anillos de vidrio en donde fueron agregados 50 µL de diferentes concentraciones de los purines en pequeños pozos sobre placas de agar PDA, arveja (*Pisum sativum*) y centeno (*Secale cereale*) previamente inoculados en superficie con el fitopatógeno. Todos los procedimientos se realizaron por triplicado. Siete días post-infección, se evaluó el efecto antagónico, encontrándose que los purines de flores y raíces presentaron la formación de halos de amensalismo, competencia por espacio e inhibición en las placas de medio contra el hongo.

Palabras claves: Tizón tardío, antagonismo, biopreparados, *Solanum phureja*.

Abstract

Phytophthora infestans, is the phytopathogen responsible for the Late Blight in *Solanum* spp crops. The effective control of this fungus generates high economic costs due the use of chemical fungicides, which in turn causes serious environmental damage because of their high residuality, being highly toxic to the consumer's health as well. We are presenting here results of the inhibitory effect in different purines or fermented extracts of Chipaca (*Bidens pilosa*) on *P. infestans* *in vitro* growth. By using the cylinder or glass rings methods, we tested four different purines leaves and stems, roots, flowers and the total mixture of all *B. pilosa* components. There were added 50 uL to small wells in PDA, pea (*Pisum sativum*) and rye (*Secale cereale*) agar plates that were previously inoculated in the surface with the pathogen. Our results were in triplicates. At seven days postinfection, we evaluated the antagonistic effect, finding in flowers and roots mixtures purines formation of amensalism, competition for space and growth inhibition as a response against the fungus

Keywords: Late blight, antagonism, biopreparado, *Solanum phureja*

Introducción

El tizón tardío de la papa (*Solanum* spp.) causado por el oomycete *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary (FRY, 2008), constituye un problema en la producción del cultivo de papa, demandando altas dosis de biocidas que inciden en los costos de producción, la resistencia, y daños en los suelos agrícolas. Se ha evaluó el uso de preparados vegetales como purines, obtenidos por

Resumos do VI CBA e II CLAA

descomposición de diferentes partes de una planta, la cual fue seleccionada por sus propiedades alelopáticas y antimicrobianas, cuyos compuestos son potenciados por la acción de los microorganismos nativos de estas plantas, los cuales afectan el desarrollo y crecimiento de hongos fitopatógenos (LEE, 2003).

La creciente demanda por el uso de estos biopreparados, abre la oportunidad de mercado para las fincas agroecológicas, dedicadas a la producción de alimentos o productos ecológicos, más sanos para la salud humana y de mayor calidad nutricional. En Cota (Cundinamarca- Colombia), productores han comenzado la aplicación de purines de manzanilla (*Matricaria recutita*) al suelo de forma empírica, observando una reducción en la incidencia de *Sclerotinia* sp. en cultivos de lechugas (LEE, 2003). La agricultura agroecológica sigue en la búsqueda de soluciones para controlar el tizón tardío, creando como base el uso de caldos minerales, purines y extractos naturales, como fungicidas agroecológicos de carácter preventivo (DONAIRE y GARCIA, 2006).

Esta investigación tuvo como fin, evaluar *in vitro* el efecto inhibitor de diferentes tipos de purines de Chipaca (*Bidens pilosa*), para determinar el efecto antagónico contra *P. infestans*.

Metodología

Preparación de purines: Se prepararon cuatro purines diferentes de Chipaca (*Bidens pilosa*) obtenida en una finca de San Francisco (Cundinamarca-Colombia). Un purín de flores (F), uno de hojas y tallos (HT), raíces (R) y la mezcla de todo el material vegetal (M), adicionando los ingredientes específicos, según la guía de preparación de purines de RAMÍREZ (1999). Se conservaron a temperatura ambiente y en agitación constante durante un mes (periodo de fermentación).

Aislamiento del patógeno: El aislamiento del patógeno se realizó a partir de hojas y tallos afectadas por *P. infestans* de un cultivo de papa (*Solanum phureja*) ubicado en la finca Gabeno. Se tomó muestra del área afectada del material vegetal y se inoculo en agar centeno, se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante siete días. Posteriormente, se realizaron observaciones microscópicas para establecer si era *P. infestans*.

Actividad antagónica de los diferentes tipos de purines de chipaca sobre el crecimiento de *P. infestans*: Se realizó la siembra masiva del fitopatógeno en placas con agar PDA, centeno y arveja. Empleando la técnica del cilindro o anillos de vidrio de Gauze, sobre la superficie del medio se colocaron pequeños cilindros plásticos estériles de 1 cm de largo y distribuidos en la superficie del medio de cultivo, dentro de los cilindros se inocularon 50 μ L las diferentes concentraciones de cada uno de los purines (100%, 70%, 50%, 20%) y el control (agua destilada estéril), se incubaron a temperatura ambiente, en oscuridad durante siete días (VALENCIA, 2004).

Evaluación antagónica: Se consideró positiva la acción antagónica de los purines contra *P. infestans* por la presencia de halos de inhibición alrededor de los cilindros, por competencia por espacio de los microorganismos presentes en los purines y amensalismo. Además, se determinó el diámetro en mm de la inhibición excluyendo la zona ocupada por el cilindro, restando su área, para hallar el valor o el grado de inhibición.

Resultados y discusiones

La inhibición de los purines fue diferente de acuerdo con el medio de cultivo empleado. En las placas de agar PDA, a los siete días, se encontró que el purín de flores (F) demostró mejores halos de inhibición, con promedios de 52mm al 100%, 45mm al 70% y 50% y 39mm al 20%, superando los 10mm comparado con los otros purines (HT, R, M) y sus respectivas concentraciones (Figura 1), en este caso también se pudo observar que la inhibición del purín HT

Resumos do VI CBA e II CLAA

fue la más leve, el control con agua resultó negativo, únicamente se observó crecimiento del fitopatógeno (Figura 2A).

El purin de flores en concentración del 100% mostró halos más definidos (Figura 2B), además no sólo evitó la dispersión de *P. infestans* por el medio de cultivo, sino que a los 10 días comenzó una desaparición progresiva del micelio fúngico y la zona necrosada fue aumentando, donde se encontraba el hongo *P. infestans* fue quedando una masa gelatinosa de color crema (Figura 3). En estudios similares realizados por Ezziyyani y Col. (2004), este fenómeno observado puede ser causado por la inhibición y destrucción del micelio de los hongos fitopatógenos por la acción de uno o varios antibióticos producidos por bacterias con un amplio espectro antifúngico.

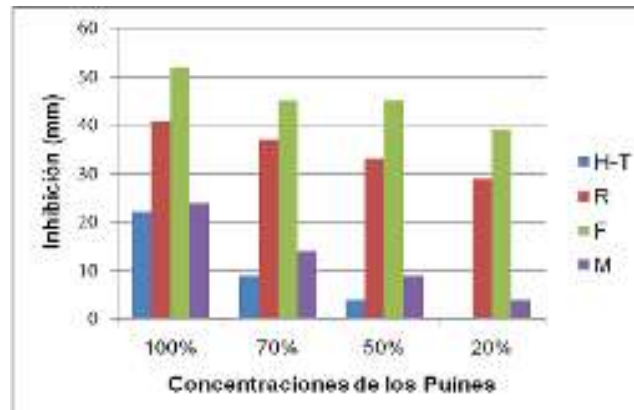


FIGURA 1. Inhibición *in vitro* de los purines (HT, R, F, M) en agar PDA sobre el crecimiento de *P. infestans* comparando las concentraciones (100%, 70%, 50% y 20%).



FIGURA 2. (A) Izq. Control. (B) der. Antagonismo *in vitro* de *P. Infestans* por el efecto del purín de flores de Chipaca (*Bidens pilosa*) al 100% en agar PDA.



FIGURA 3. Desaparición del micelio fúngico de *P. infestans*, la colonia quedó reducida a una masa gelatinosa de color crema. Agar arveja

En la placa de agar arveja, el purín de raíces reveló a los siete días después de la siembra, el mayor efecto antagonístico en comparación con los demás purines (HT, F, M) con 77mm al 100%, 66mm al 70%, 65% al 50% y 57% al 20%, superado los 10mm en comparación con purines (HT, F, M) y sus concentraciones (Figura 4), en este caso también se pudo apreciar que la inhibición del purín HT fue menor, solo se observó crecimiento del fitopatógeno. Este purín demostró inhibición causada por gran cantidad de microorganismos que compitieron por espacio y desplazaron al fitopatógeno (Figura 5).

En Agar centeno no se observó antibiosis, el crecimiento de *P. infestans* tuvo la mejor esporulación. Losoya y Col. (2006), aislaron de follaje de papa, diferentes cepas de *Pseudomonas* sp. y de *Trichoderma* sp., encontrando antagonismo por competencia de espacio contra *P. infestans*. Se ha establecido que la capacidad inhibitoria de los purines contra patógenos, se debe a sus propiedades alelopáticas, bioquímicas y/o nutricionales que son

potenciadas por la acción de microorganismos que se encuentran allí (LEE, 2003).

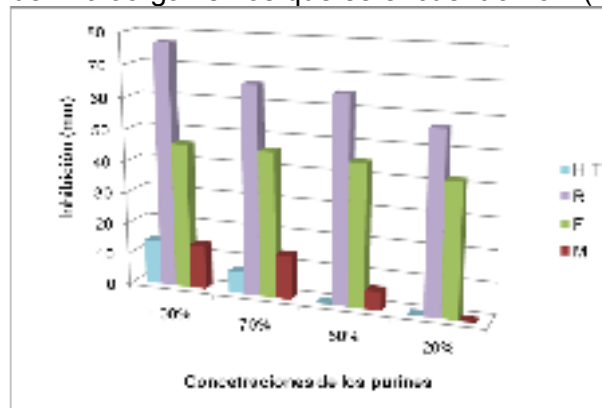


FIGURA 4. Inhibición *in vitro* de los purines (HT, R, F, M) en agar arveja sobre el crecimiento de *P. infestans* comparando las concentraciones (100%, 70%, 50% y 20%).



FIGURA 5. (A) izq. Control. (B) der. Antagonismo *in vitro* de *P. Infestans* por el efecto de los diferentes purines de Chipaca (*Bidens pilosa*) en agar arveja.

Conclusiones

Se pudo establecer el efecto antagónico de los purines de Raíces y Flores contra *P. infestans*, por inhibición y competencia de espacio, causada posiblemente por los microorganismos presentes en los purines y sustancias microbianas tóxicas, como antibióticos. Los purines o extractos fermentados de plantas de Chipaca, se pueden convertir en una alternativa viable para el control del *P. infestans*. Sin embargo, es necesario continuar con investigaciones que determinen el efecto de estos purines en ensayos en invernadero y en campo.

Referencias

- DONAIRE, R., GARCÍA, W. Alternativa agroecológica para el control del tizón tardío, *Phytophthora infestans* de la papa en Colombia. Nova, Bolivia, v. 3, n. 3. p. 564-577, 2006.
- EZZIYYANI, M. et al. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*, España, v. 26, p. 61-68, 2004.
- FRY, W. Plant diseases that changed the world *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, New York, v. 9, n. 3, p. 385-402, 2008.
- LOSOYA H. et al. Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Agrociencia*, México, v. 40, n. 4. p. 491-499, 2006.
- LEE, R. Reconversión de fincas a producción sostenible: Metodología interactiva. Centro De Investigaciones y Asesorías Agroindustriales - CIAA, Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, 2002.

Resumos do VI CBA e II CLAA

RAMIREZ, C. Purines, herramienta útil para proteger y mejorar cultivos. Guía para su preparación, uso y manejo. Colombia. 1996.

VALENCIA, H. Manual de prácticas de microbiología básica. Colombia, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional, 2004.158 p.