

ESTUDIO DE EXTRACTOS VEGETALES EN LA INHIBICIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ZOOSPORAS DE *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*

María Alejandra Fajardo¹; Elena Paola González Jaimes²; Hader Iván Castaño³

¹Ingeniera Agropecuaria, Estudiante de maestría en bosques y conservación ambiental Universidad Nacional de Colombia. Joven Investigador Colciencias, Laboratorio de Sanidad Vegetal. Medellín, Colombia. maafajardome@unal.edu.co

²PhD. Docente Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid - Facultad de Ciencias Agrarias - Laboratorio de Sanidad Vegetal. Medellín, Colombia. epgonzalez@elpolil.edu.co

³MSc. Docente Facultad de Administración, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid - Facultad de Administración - Laboratorio de Química. Medellín, Colombia. hicastano@elpolil.edu.co

RESUMEN

Se buscó determinar el extracto vegetal y la concentración que propicia mayor inhibición en la liberación de zoosporas, con el fin de utilizar estos extractos para el control de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. El diseño estadístico utilizado es en parcelas divididas en el tiempo (5 mediciones) con submuestreo bajo un diseño completamente al azar con 21 tratamientos. Los tratamientos están compuestos de un arreglo factorial 3x2x3+3 correspondientes a tres fuentes vegetales (*Matricaria chamomilla* L., *Datura stramonium* L., *Lippia alba* L.), dos tipos de extracto (aéreo y raíz) y tres concentraciones (0.5%, 1.0% y 1.5%). Los testigos fueron agua destilada y dos variedades de papa susceptibles (*Solanum andígena* y *Solanum pureja*) con 3 repeticiones por tratamiento. Se encontró que los extractos que mostraron mayor inhibición de zoosporas fueron *Datura stramonium* L aéreo 1% y 1.5%, *Lippia alba* Mill. aéreo 1% y 1.5%, los cuales mostraron diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% comparadas con los demás extractos y los dos testigos susceptibles.

Palabras clave: Quistosoro, sarna polvosa, *Matricaria chamomilla* L., *Datura stramonium* L., *Lippia alba* Mill.

Recibido: 01 de octubre de 2013.

Acceptado: 03 de diciembre de 2013.

Received: October 1st, 2013.

Accepted: December 3rd, 2013.

STUDY OF PLANT EXTRACT ON THE ZOOSPORES RELEASE INHIBITION OF *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*

ABSTRACT

Spongospora subterranean f.sp. *subterranea*, is a soil pathogen affecting root system and potato tubers. This study aims to determine the plant extract and the concentration causing highest inhibition in the zoospores release, in order to use these extracts in field trials for the control of *S. subterranea*. The experiment consist of a factorial 3x2x3 +3 array for three plant sources (*Matricaria chamomilla* L., *Datura stramonium* L., *Lippia alba* L.), two types of extract (aerial and root) and three concentrations (0.5%, 1.0% and 1.5%). The controls were divided in absolute control (distilled water) and two susceptible varieties (*Solanum andígena* y *Solanum Phureja*) with 3 replicates. It was found that the extracts showing greater inhibition of zoospores were *Datura stramonium* L.aereal 1%, 1.5% and air *Lippia alba* L. 1% 1.5%, which showed significant differences compared with the other treatments and two susceptible control varieties.

Keywords: *Cistosori*, powdery scab, *Matricaria chamomilla* L., *Datura stramonium* L., *Lippia alba* L.

1. INTRODUCCIÓN

Spongospora f. sp. *subterranea* un parásito obligado que causa la sarna polvosa de la papa y es además vector del pomovirus *Potato Mop-Top virus* (PMTV). Este patógeno del suelo limita la producción de papa de manera importante, llegando a excluir zonas para este cultivo. *S. subterranea* es un protozoo que pertenece al orden Plasmodiophorales el cual es un grupo monofilético, cuyos miembros tienen en común características como la división nuclear cruciforme, zoosporas con dos flagelos, fase ameboidal, protoplasto multinucleado, plasmodios, parasitismo intracelular obligado y esporas de resistencia denominadas quistosoros [1],[2].

La infección de la enfermedad inicia con la liberación de las zoosporas primarias la característica de estas es que son biflageladas y son liberadas a partir de los quistosoros, las zoosporas se enquistan en la superficie de las células del hospedero e infectan la epidermis. Posteriormente se desarrolla un plasmodio y después un zoosporangio. Un zoosporangio tiene la capacidad de producir zoosporas secundarias las cuales son liberadas de las células del hospedero con el fin de iniciar otro ciclo de infección. Por otro lado los zoosporangios se reproducen por multiplicación sexual los cuales pueden producir muchas esporas de resistencia llamadas (soros) que se agrupan hasta formar los quistosoros. Cada soro tiene la capacidad de liberar una sola zoospora primaria biflagelada, la cual está formada por paredes gruesas las cuales son altamente persistentes [3], [4].

Bajo condiciones de laboratorio se puede dar el enquistamiento de las zoosporas debido a una alta concentración de químicos o una agitación mecánica [5].

S. subterranea f. sp. *subterranea* permanece en el suelo en forma de quistosoros los cuales pueden sobrevivir por más de seis años en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, que generalmente coinciden con las del cultivo, las esporas de resistencia originan las zoosporas, que infectan los pelos radicales, raíces y posteriormente a los tubérculos a través de las lenticelas, heridas y yemas [6].

La enfermedad afecta raíces, estolones y tubérculos. Las raíces de las plantas enfermas

muestran agallas o tumores lisos, de 0,5 a 1,5 cm de tamaño y de forma más o menos irregular; al inicio de la infección las agallas son de color blanquecino y cuando alcanzan la madurez fisiológica se vuelven oscuras, debido al color marrón de las paredes de las estructuras de resistencia [7].

El estado de infección radical de *S. subterranea* f. sp. *subterranea* durante su ciclo de vida sobre las plantas de papa y posiblemente hospederos alternos, es muy importante para la epidemiología de la sarna polvosa, debido a que la infección radical incrementa rápidamente las zoosporas y esporas de resistencia en los suelos donde crecen las papas y especies hospederas, especialmente si los materiales son muy susceptibles a la infección radical y a la formación de agallas [5]. Se ha adquirido conocimiento sustancial en la última década sobre la biología del patógeno y la epidemiología de la enfermedad, pero ninguna medida de control efectiva [8], [33].

Aun no se ha encontrado un método de control efectivo contra este patógeno que permita la reducción del inóculo o su capacidad de infección [7], [9], [10] llegando al consenso en que la solución al problema debe ser abordado de manera integral [11].

Se han utilizado diversas técnicas microbiológicas para demostrar la actividad antimicrobiana de las plantas superiores frente a microorganismos patógenos. Por lo anterior es posible encontrar una estrategia para un manejo integrado en el control de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. Se ha demostrado que los compuestos volátiles liberados de la hoja y material proveniente de raíz de cultivos de la familia Brassicaceae inhiben el crecimiento de varios patógenos fúngicos del suelo in vitro, lo que indica actividad antifúngica contra importantes patógenos de la papa [12].

Diversas experiencias han señalado la efectividad de extractos de plantas y aceites esenciales en el control de hongos causantes de afecciones foliares, del suelo y de granos almacenados [13]. En este sentido [14] reportaron la disminución del crecimiento micelial y de la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill) al utilizar extractos de semillas de toronjas (*Citrus paradisi* M.), por lo que aunque no existen reportes de experiencias similares en el control de *S.*

subterranea f. sp. *subterranea*, el empleo de esta estrategia podría representar una alternativa de control de la enfermedad [15].

Pronto alivio (*Lippia alba* Mill), es una de las plantas con alto potencial antifúngicos dado que sus compuestos activos presentan gran actividad antifúngica, antibacteriana, con posibilidades de agroindustria: actúa sobre diferentes sistemas del organismo aportando beneficios y es una planta alternativa que se desarrolla en la zona intertropical [16].

Estudios identificaron 43 compuestos volátiles del aceite esencial de *L. alba*, de los cuales 20 se reporta por primera vez. El alto contenido de carvona que es un terpeno presente en muchos aceites esenciales, este compuesto hace suponer que se tiene un nuevo quimiotipo. Este aceite esencial presenta alta actividad antibacteriana, en bacterias gram positivas, con concentraciones mínimas inhibitorias entre 0,31 y 0,63 mg mL⁻¹ [17]. Por otro lado otras investigaciones muestran claramente una fuerte actividad antifúngica de una mezcla elaborada a partir de *Datura stramonium*, *Calotropis gigantea*, *Azadirachta indica* (neem) y estiércol de vaca (T1), seguido de metanol-agua (70/30 v/v extractos de *D. stramonium*, *C. gigantea* y *A. indica* (T2) contra *Fusarium mangiferae*. El estudio demostró que el brebaje elaborado de compost (T1) es eficaz, de bajo costo, fácil de preparar y constituye un enfoque sostenible y considerado con el medio ambiente para controlar malformación floral en mango cuando esta es rociada en la etapa de brotación y en la fase de formación del fruto [18].

Otros estudios han demostrado actividades antifúngicas de *D. stramonium* contra *R. solani*, en los cuales se observa que el extracto de hoja de *D. stramonium* redujo significativamente el crecimiento de *R. solani* y otros cuatro hongos presentes en el suelo [19].

Matricaria recutita inhibió el crecimiento de saprófitos oportunistas de 3,98 a 64,29% para *Aspergillus flavus*, 6,38-93,62% para *A. fumigatus*, 3,52-89,45% para *A. niger*, 6,38-77,66% de *Trichoderma harzianum* y 17,41 a 89,41% para *Fusarium oxysporum* en concentraciones de dos veces en serie de 15,62 a 1000 g mL⁻¹ [20].

Estos resultados indican que *M. recutita* podría ser considerado como un candidato potencial para el

diseño de formulaciones de antifúngicos eficaces adecuados para el tratamiento de las infecciones por hongos dermatofitosis y otras [20]. Adicional a esto *M. recutita* en concentración de 0,1% mostró actividad antifúngica contra *Pseudocercospora griseola*, demostrando que afecta la eficiencia en la germinación de dos cepas 63-31 y 63-63 del patógeno. Los valores medios de inhibición de germinación fueron superiores a 93,57% [21].

El Hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill.), la Mejorana (*Origanum majorana* L.) y la Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) mostraron un efecto inhibitor sobre los hongos del suelo que causan la enfermedad de los almácigos. El uso de especies de plantas en polvo o extracto para tratamiento de semillas puede ser considerado para el control de patógenos transmitidos por el suelo, teniendo en cuenta la preservación del medio ambiente y el efecto secundario de la aplicación de plaguicidas [34].

La actividad antifúngica del aceite esencial de flor de *M. chamomilla* se evaluó frente a *Aspergillus niger* donde los resultados mostraron una inhibición en el crecimiento de *A. niger* del 92,50% a una concentración del aceite esencial de 1000 µg mL⁻¹. Se observó un retraso marcado en producción de conidios del hongo e inhibición de crecimiento de las hifas [22].

Las principales alteraciones morfológicas observadas en las hifas de *A. niger* fueron interrupción de las membranas citoplasmáticas y orgánulos intracelulares, desprendimiento de membrana plasmática de la pared celular, agotamiento del citoplasma y la completa desorganización de los compartimientos de las hifas. Esto podría ser por el efecto de la permeabilidad celular a través de la interacción directa del aceite esencial de *M. chamomilla* con la membrana plasmática de hongos. Estos resultados indican el potencial antifúngico del aceite esencial de *M. chamomilla* L. en la prevención contra patógenos [22].

El objetivo de este trabajo fue seleccionar entre extractos vegetales de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Datura (*Datura stramonium*) y Pronto alivio (*Lippia alba*), evaluados a diferentes concentraciones, los que presentaran mayor inhibición en la liberación de zoosporas de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en condiciones controladas.

2. MATERIALES Y METODOS

Obtención de inóculo. El inóculo de *S. subterranea* fue obtenido a partir agallas de raíces infectadas por el patógeno, en el municipio de la Unión (Antioquia). Las raíces infectadas se llevaron al laboratorio y se lavaron con agua corriente con el propósito de retirar el suelo adherido, posteriormente se secaron por 48 horas al aire libre. De las raíces secas se retiraron las agallas y se maceraron para disminuir el tamaño de las partículas, luego el macerado se separó en tamices de 90 y 25 micras para obtener finalmente los quistosoros.

Cuantificación de quistosoros. El conteo se realizó siguiendo la metodología de [23]. Una vez obtenidos los quistosoros de raíz se efectuó el conteo al microscopio en cámara de Neubauer, se pesaron 0,1 gr de inóculo en balanza analítica (Boeco BPB52, Germany) y luego se adicionaron 10 mL de agua destilada; la solución fue realizada en tubos Falcon de 15 mL. Consecutivamente se desarrollaron 10 lecturas con dos repeticiones en la cámara y con los datos obtenidos se determinó la concentración de quistosoros por gramo de inóculo en cada muestra el cual se llevó a una concentración de 1×10^4 quistosoros mL⁻¹ para la inoculación.

Propagación de plantas. Las plantas seleccionadas para la elaboración de los extractos fueron Manzanilla (*M. chamomilla*) Datura (*D. stramonium*) y Pronto alivio (*L. alba*). Para la propagación de datura y manzanilla se utilizó semilla sexual y en el caso de Pronto alivio se utilizaron estacas.

La propagación de Manzanilla y Datura se realizó en el Centro Agrario Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. El material vegetal de Pronto alivio fue recolectado en el municipio de Caramanta (Antioquia) en lotes donde esta planta crece de forma natural, este arbusto bajo condiciones de cultivo, se desarrolla mejor en suelos franco a franco arenosos, entre 15 y 25°C y precipitación entre 700 y 1.500 mm anuales [24]. Las plantas fueron colectadas en su etapa vegetativa.

Elaboración de extractos etanólicos: Después de llevado el material vegetal al laboratorio se pesaron las muestras de Datura, Pronto alivio y Manzanilla, posteriormente se secaron en horno a 37°C y se

determinó el peso seco para ser procesadas en el molino, siguiendo la metodología de [25].

Las muestras vegetales después de ser pulverizadas en el molino, fueron maceradas en etanol al 96% (120g de material vegetal en 450 mL de etanol) el macerado se almacenó en frascos ámbar, para evitar fotodegradación y fueron dejados en agitación por 12 horas a temperatura ambiente. Transcurridas las 12h, se filtró el macerado a través de 4 capas de gasa, transfiriéndolo a un Beaker, el extracto allí obtenido fue envasado nuevamente en frascos ámbar y guardado en la nevera a 4°C para su preservación.

Extracto obtenido en el rotoevaporador: Para la obtención del extracto etanólico se realizó la destilación de Datura, Manzanilla y Pronto alivio con la ayuda de un Rotoevaporador Heidolph® durante 30 minutos, siguiendo la metodología usada por [26]. Se separó el alcohol del macerado obteniendo así el extracto etanólico puro, posteriormente se adicionaron 10 ml de agua destilada para disolver el extracto etanólico puro resultante, este extracto pasó nuevamente por filtrado, para disminuir las partículas vegetales que hubieran quedado y tener una mayor disposición de metabolitos secundarios. Posteriormente los extractos se almacenaron en tubos Falcon forrados en papel aluminio y fueron llevados nuevamente a la nevera a 4°C.

Preparación del extracto de raíz: La preparación del extracto de raíz se realizó con raíces sanas de papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro, siguiendo la metodología utilizada por [23], la cual consiste en lavar las raíces frescas y licuarlas en agua destilada en una relación de 1:10. Este procedimiento fue realizado el mismo día del montaje para evitar fermentación en la solución preparada [23].

Tratamientos y diseño experimental: Siguiendo los resultados de [5], sobre condiciones para la liberación de zoosporas de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*, en este ensayo se evaluaron extractos aéreos y radiculares en forma etanólica. El diseño estadístico utilizado fue parcelas divididas en el tiempo (5 mediciones) con submuestreo bajo un diseño completamente al azar con 21 tratamientos. Los tratamientos están compuestos de un arreglo factorial 3x2x3+3 testigos correspondientes a tres fuentes vegetales (datura, manzanilla y pronto alivio), dos tipos de

extracto (aéreo y raíz) y tres concentraciones (0.5%, 1.0% y 1.5%). Con 3 repeticiones por tratamiento Los testigos corresponden a un testigo absoluto (agua destilada) y dos testigos susceptibles (Diacol Capiro y Criolla Colombia).

Cada repetición se realizó en un Tubo tipo Falcon de 15 ml donde se depositó extracto vegetal e inóculo de agalla de raíz a una concentración de 1×10^4 quistosoros mL^{-1} , posteriormente se realizaron observaciones en cámara Neubauer cada 24 horas, iniciando a las 24 hasta las 120 horas. Las muestras estuvieron bajo condiciones de laboratorio en cámara de crecimiento, a temperatura fluctuante de 20-15° C (12/12), [5]. Para evaluar las temperaturas se empleó una DBO industrial Centricolltd modelo FF16HAK.

El conteo se realizó en cámara de Neubauer, tomando una alícuota de 10 μl de la muestra para cada lado de la cámara. La observación se desarrolló en un microscopio de luz Nikon Eclipse E-200 con un objetivo de 40X, donde se contaron el número de zoosporas móviles de acuerdo a la forma de las estructuras, tipo de movimiento y disposición de los flagelos.

El análisis de los datos se realizó, utilizando el programa SAS System (GLIMMIX Procedure) en donde se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer con un intervalo de confianza del 95%. Las observaciones se realizaron en el laboratorio de Sanidad Vegetal del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, sede Bello.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indicaron que el extracto etanólico de Pronto alivio fue más eficiente en términos de materia seca comparado con el de Manzanilla y Datura, con un porcentaje de 25.6, 14.7 y 6 respectivamente. Esto quiere decir que se necesita menor cantidad de material vegetal de Pronto alivio para producir 1000mL de extracto vegetal comparado con Manzanilla y Datura.

Reconocimiento de zoosporas: El montaje de bioensayos permitió la observación de zoosporas primarias denominadas así porque se obtienen a partir de quistosoros y son la fuente inicial de inóculo que desarrolla la infección en sus etapas iniciales [27].

Para el presente ensayo se tuvo en cuenta los resultados de [5], en donde se encontró que las mejores condiciones de liberación corresponden a la fluctuación en temperatura 20-15°C la cual simula el cambio día-noche, requiriéndose un tiempo entre las 24 y 96 horas después de la inoculación para obtener la mayor liberación de zoosporas. [28] en trabajos con tomate, mostró que la temperatura óptima para la infección de los pelos radicales por *S. subterranea* es de unos 16-17°C y que las temperaturas mínimas y máximas están entre 11°C y 22-25°C, respectivamente.

En estudios realizados se encontró mayor liberación en temperaturas cercanas a 20-23°C. [23] Todas estas diferencias evidencian los distintos estudios desarrollados bajo condiciones ambientales totalmente disímiles lo que puede intervenir en la respuesta del patógeno. Adicional a esto puede existir una diferencia entre poblaciones de *S. subterranea* halladas en Europa y las encontradas en América como lo sugieren [29].

En el análisis de varianza que se presenta en la tabla 1 es de resaltar la interacción triple de mayor orden PV*Tipo*Tiempo. En donde se observa claramente la interacción entre producto vegetal (PV), parte aérea o de raíz (Tipo) utilizado y tiempo transcurrido por lo que se realizó comparación de medias y la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, estas variables tienen una alta interacción, la cual será explicada más adelante.

El otro efecto significativo importante fue concentración que se muestra resaltado en la tabla 1 en donde pese a su importancia no presenta interacción con los demás tratamientos.

En la tabla 1, se observa la interacción triple PV*Tipo*Tiempo. En esta se observa claramente la interacción entre producto vegetal (PV), parte aérea o de raíz utilizado (Tipo) y tiempo transcurrido, revelando que el extracto vegetal de Manzanilla tanto de raíz como aéreo no presentaron diferencia significativa, mientras que para los extractos de Datura y Pronto alivio aéreo si se presentaron diferencias significativas siendo estos los extractos que más inhiben la liberación de zoosporas de *S. subterranea*. En el caso de Datura parte aérea existe diferencia significativa en el tiempo a las 24, 72, 96 y 120 horas y para el caso de Pronto alivio existe diferencia significativa en el tiempo a las 24, 48, 72 y 120 horas.

Tabla 1. Análisis de varianza mediante prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, donde muestra el efecto de las interacciones sobre la liberación de zoosporas. Producto vegetal (PV), parte aérea o de raíz (Tipo) utilizado, tiempo, concentración (Con) y Testigo.

Type I Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Tiempo	4	10	30.35	<.0001
Testigo	3	3267	199.18	<.0001
PV(testigo)	2	3267	53.97	<.0001
Conc	2	3267	7.06	0.0009
Tipo	1	3267	240.97	<.0001
PV*Conc	4	3267	0.83	0.5041
PV*Tipo	2	3267	69.02	<.0001
Tipo*Conc	2	3267	0.57	0.5666
PV*Tipo*Conc	4	3267	2.10	0.0780
testigo*Tiempo	12	3267	3.61	<.0001
PV*Tiempo	8	3267	3.95	0.0001
Conc*Tiempo	8	3267	0.65	0.7320
Tipo*Tiempo	4	3267	3.32	0.0101
PV*Conc*Tiem	16	3267	0.58	0.9027
PV*Tipo*Tiem	8	3267	3.72	0.0002
Tipo*Conc*Tiem	8	3267	1.09	0.3700
PV*Tip*Con*Tie	16	3267	0.41	0.9802

Es posible que esta diferencia se deba al comportamiento natural de las zoosporas en condiciones ambientales adecuadas. Estudios realizados por [23], sugirieron que los exudados de raíz tiene una alta influencia en la liberación de zoosporas, lo cual ocurre entre 15-23°C a partir de las 48 y hasta 96 horas, sin embargo no encontraron diferencias entre las fuentes de inóculo, lo que indica que independiente de su origen, cuando existen las condiciones ambientales adecuadas, los quistosoros pueden liberar zoosporas que potencialmente pueden iniciar el proceso de infección en el hospedero.

A las 24 horas se encontró diferencia significativa en el caso de agua destilada comparada con Pronto alivio aéreo y Datura parte aérea. Se observa que Datura aéreo y Pronto alivio aéreo tienen un mayor efecto inhibitor de zoosporas las primeras 24 horas y mantiene su efecto inhibitor medianamente constantes comparado con los demás tratamientos.

Las plantas tienen la capacidad de producir y almacenar diferentes cantidades de metabolitos

secundarios, las propiedades de estos compuestos pueden variar de acuerdo al entorno del organismo productor [31].

Adicional a esto se observa que la mayor liberación de zoosporas se presenta en todos los extractos realizados con parte de raíz, evidenciándose diferencias en el número de zoosporas con respecto a los extractos utilizados con parte aérea a excepción de manzanilla, cabe anotar el bajo número de zoosporas liberadas en agua destilada con respecto a todos los extractos realizados con parte de raíz y la Manzanilla parte aérea, lo que indica que para que el patógeno libere las zoosporas debe existir algún estímulo adicional además del agua libre.

Se observa claramente que la liberación en el tiempo es mayor en extracto de raíz de papa Criolla Colombia comparado con los demás tratamientos, sin embargo el extracto de raíces de Diacol Capiro también muestra una alta liberación de zoosporas, siendo más marcada a las 72 horas con respecto a los demás tratamientos (Figura 1). Resultados que coinciden con [5], quienes afirma que las zoosporas fueron obtenidas utilizando la fluctuación en temperatura 20-15°C la cual simula las condiciones día-noche, extracto de raíz, en un tiempo de 72 horas, lapso en el cual se encuentran mayores valores de liberación. De otro lado [23], encontró mayor liberación de zoosporas en solución de extracto de raíz de papa puesto que los demás sustratos utilizados no arrojaron resultados significativos.

Estudios demostraron que las zoosporas se sienten fuertemente atraídas por los exudados de las raíces ejerciéndose una quimiotaxis positiva [7]. Otros estudios muestran que la estimulación por los exudados radicales podría ser un factor importante en la liberación diferencial de zoosporas primarias [30].

En el caso de extracto de raíz de Diacol Capiro se evidencia un aumento en el número de zoosporas a las 72 horas, mostrando así el pico de liberación de este tratamiento. Un comportamiento similar se observó con todos los tratamientos a excepción de Datura parte aérea la cual mostró que el pico de liberación fue a las 96 horas.

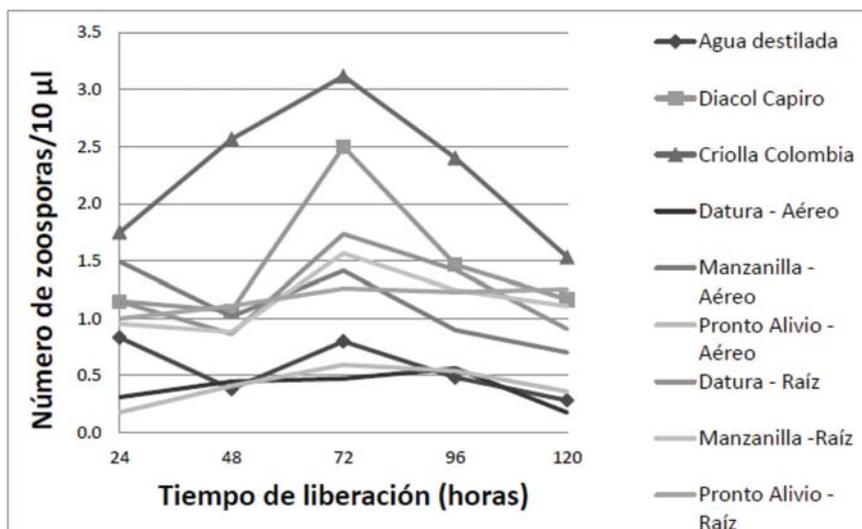


Figura 1. Liberación de zoosporas en el tiempo a partir de la interacción de mayor orden PV*Tipo*Tiempo.

En todos los tratamientos excluyendo Pronto alivio parte aérea y de raíz se observa una disminución en la liberación de zoosporas después de las 96 horas, mostrando que la mayor liberación para todos los tratamientos se dio entre las 48 y 96 horas con una fluctuación en temperatura 20-15°C, además se observa que a las 120 horas para todos los tratamientos a excepción de Manzanilla raíz, Pronto alivio aéreo y raíz existe una disminución de liberación de zoosporas. [5], demuestra que en términos generales la mayor liberación ocurre entre las 48 y las 96 horas, mostrando disminución a partir de las 120 horas. [30], afirman que a 16 y 20°C se observa una gran concentración de zoosporas durante los primeros días, sin embargo conforme pasaban los días, las concentraciones disminuyeron drásticamente.

A las 24 horas se encontró diferencia significativa en el caso de agua destilada comparada con Pronto alivio aéreo y Datura parte aérea. Se observa que Datura aérea y Pronto alivio aéreo tienen un mayor efecto inhibitor de zoosporas las primeras 24 horas y mantiene su efecto inhibitor medianamente constantes comparado con los demás tratamientos.

Estudios realizados en esta investigación mostraron que no existen diferencia significativa entre las concentraciones 0.5 y 1 % ni entre 1 y 1.5%, mostrando que las dos mejores concentraciones para inhibir la liberación de zoosporas de *S. subterranea* son 1 y 1.5%. Por lo anterior Datura parte aérea y Pronto alivio parte aérea en concentraciones de 1.5 y 1% en ambos casos,

mostraron los mejores resultados de inhibición (Figura 1).

Estudios realizados encontraron que existen diferencias en los promedios de liberación de zoosporas en agua, NPK y exudados de las raíces, siendo todos significativamente diferentes, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este experimento pues se manifiesta claramente una gran diferencia en cuanto a la liberación de zoosporas entre las concentraciones de los extractos, el agua destilada (testigo absoluto) y extractos de raíz de papa (testigos susceptibles) [32].

Estudios confirman que en condiciones *in vitro* los extractos crudos de *Allium sativum* L., *Capsicum annuum* L., *Prunus persica* L. y *Populus nigra* L. inhiben el crecimiento del patógeno de *Botritis cinerea*, así como la esporulación y germinación de esporas, de modo que ayudan a controlar las enfermedades de frutos y hortalizas.

4. CONCLUSIÓN

La inhibición de zoosporas de *S. subterranea* f. sp. *subterranea* para el control de la sarna polvosa mediante extractos de plantas, indican su potencial para ser usados en tratamientos preventivos. Es necesario realizar nuevos estudios para determinar la durabilidad en el tiempo de los metabolitos secundarios producidos por las plantas ya que se observó que las primeras 24 horas es donde tienen

mejor efecto para el caso de extractos de *Datura stramonium* L. y *Lippia alba* Mill, aunque en el tiempo la tendencia de baja liberación de zoosporas en estos extractos fue constante, lo que puede indicar que los exudados de estas plantas pueden inhibir la liberación de las zoosporas o no ser atrayentes para este microorganismo.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias a Colciencias por la financiación de joven investigador, al Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid grupo SAT por la financiación del proyecto y al Centro Agrario Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia por prestar sus instalaciones.

6. BIBLOGRAFÍA

- [1] Karling, J.S. The *Plasmodiophorales*: including a complete host index, bibliography and a description of disease caused by species of this order. P. imprenta: The author. New York., 144p, 1942.
- [2] Braselton, J.P. Generalized *Plasmodiophorid* life cycle based on several sources. Disponible en: <http://oak.cats.ohiou.edu/~braselto/plasmos>. [consultado el 15 July 2013].
- [3] Falloon, R.E. Control of Powdery Scab of Potato: Towards Integrated Disease Management. American Journal Potato Research 85 (4): 253-260, 2008.
- [4] Merz, U. Powdery Scab of Potato-Occurrence, Life Cycle and Epidemiology. American Journal of Potato Research 85(4): 241-246, 2008.
- [5] Corrales, P.C. Zuluaga, A.C. Cotes, J.M. y González. E.P. Determinación de las condiciones óptimas para la liberación de zoosporas de *Spongospora subterranea* en bioensayos. Tropical Plant Pathology 37(4): 239-245, 2012.
- [6] Donaldson, S.P. y Deacon, J.W. Differential encystment of zoospores of *Pythium* species by saccharides in relation to establishment on roots. Physiological and Molecular Plant Pathology 42:177-184, 1993.
- [7] Harrison, J.G., Searle, R.J., Williams, N.A. Powdery scab disease potato: A review. Plant Pathology 46:7-25, 1997.
- [8] Merz, U. y Fallon, R. Powdery Scab of Potato Increased Knowledge of Pathogen Biology and Disease Epidemiology for Effective Disease Management Potato Research 52:17-37, 2008.
- [9] Merz, U. Experiments on direct control and yield loss made in New Zealand. En Merz U, Lees AK (Eds.) *Proc. 1st Eur. Powdery Scab Workshop*. SCRI. Dundee, RU. 51-52p, 2000.
- [10] Wale, S. Potential for chemical control of *Spongospora subterranea*, cause of powdery scab of potatoes and vector of potato Mop-Top Virus. En The BCPC conference: Pest and Disease. Vols. 1 and 2. Proc. Intl. Conf. Brighton, RU. 129-134, 2002.
- [11] Falloon, R., Genet, R., y Nott, H. Powdery Scab reduces potato plant productivity. *7th Int. Cong. Plant Pathol.* Edinburgh, RU. Abstract 2.8.1, 1998
- [12] Larking, R. and Griffin, T. Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures. *Crop Protection* 26:1067-1077, 2007.
- [13] Bower, J. y Locke, J. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse. *Plant Dis.* 84: 300-305, 2000.
- [14] Rodríguez, D., Montilla, J. Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extractos de *Citrus paradisi*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 63:46-50, 2002.
- [15] Bittara, F., Rodríguez, D., Sanabria, M., Monroy, J. y Rodríguez, J. Evaluación de fungicidas y productos vegetales en el combate de la sarna polvorienta de la papa. *Interciencia.* 34(4): 265-269, 2009.
- [16] Bonilla, C., Sanchez, M. y Guzman, S. El cultivo de pronto alivio. *Lippia alba* (Miller.). *Revista científica Guillermo de Ockham.* 7 (1):8p, 2004.
- [17] Pino, J., L. Ariel, A., Pérez & M. Rodríguez. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown *Rev. Cubana Farm.* 30: 1-3. 1996.
- [18] Usha, K.; Singh, B., Praseetha, P.; Deepa N. Antifungal activity of *Datura stramonium*, *Calotropis gigantea* and *Azadirachta indica* against *Fusarium mangiferae* and floral malformation in mango. *Eur J Plant Pathol* 124:637-657. 2009.

- [19] Kagale, S., Marimuthu, T.; Thayumanavan, B.; Nandakumar, R.; Samiyappan, R. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Daturametel* against *Rhizoctoniasolani* and *Xanthomonasoryzaepv.* *Oryzae.* *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 91–100, 2004.
- [20] Jamalian, A. Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* 22 (4):308–315, 2012.
- [21] Ágredo, J., Alves, E., Rozwalka, L. y Marques, W. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. *Ciênc. agrotec., Lavras.* 36(3): 270-284, 2012.
- [22] Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S. J., Jaimand, K., y Razzaghi-Abyaneh, M. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International journal of food microbiology*, 139(3), 127-133, 2010.
- [23] Alzate, D.E., Hoyos, L.M. y González, E.P. Factores que inciden en la liberación de zoosporas de *Spongospora subterranea* (Wallroth) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 61(2): 4503-4510, 2008.
- [24] Orellana, P.D.; Martínez, J.V., Cáceres, A. Anotaciones sobre el cultivo de pronto alivio. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 11p, 1999.
- [25] Marcano, D., Hasegawa, M. *Fitoquímica Orgánica.* Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 588 p, 2002.
- [26] Rodríguez, D. y Sanabria, M. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. *Interciencia* 30(12):739-744, 2005.
- [27] Merz, U. Microscopical observations of the primary zoospores of *Spongospora subterranea*, f. sp. *subterranea*. *Plant Pathology* 46, 670 .674, 1997.
- [28] Kole, A. P. *A contribution to the knowledge of Spongospora subterranea (Wallr.) Lagerh., the cause of powdery scab of potatoes.* Land bouw hogeschool. 1954.
- [29] Jaramillo, S.; Botero, J.M. Respuesta de diferentes poblaciones de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* a la rotación con dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 60:3859-3876, 2007.
- [30] Navia, E.; Garcia, C. Estudios en la biología y patología de *Spongospora subterranea* en papa. *Revista Latinoamericana de la Papa. Suplemento Especial.* 38 p, 2004.
- [31] Firn, R.D., y Jones, C.G. Natural Products - a simple model to explain chemical diversity. *Natural Product Reports* 20(3):382-391, 2003.
- [32] Girón, J.A.; Robayo, N.J. Efecto de los exudados de la raíz de seis cultivares de papa (*Solanum tuberosum tuberosum*) en la liberación de zoosporas primarias de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá 27 p, 2006.
- [32] Hernández, A.; Bautiata, S.; Velásquez, M. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 30 (2): 119 – 123, 2007.
- [33] Falloon, R.; Russell, A.G.; Wallace, A.R.; Butler, R.C. Susceptibility of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars to powdery scab (caused by *Spongospora subterranea*), and relationships between tuber and root infection. *Australasian Plant Pathology* 32:377-385, 2003.
- [34] Nehal S. El-Mougy, and Mokhtar M. Abdel-Kader. Antifungal effect of powdered spices and their extracts on growth and activity of some fungi in relation to damping-off disease control *Journal of Plant Protection Research* 47 (3), 267-278, 2007.