

# Efecto del extracto de puerro (*Allium porrum* L.) sobre la supervivencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*

Argüello, E.; V. Yossen, E. Lucini y M. Conles

## RESUMEN

La utilización de estimulantes de la germinación de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, colocados antes de la implantación del cultivo, son una alternativa de manejo de la enfermedad. Se evaluó el efecto de un extracto de puerro (*Allium porrum* L.) sobre la supervivencia de los esclerocios del patógeno. Extracto de puerro fue colocado en cajas de Petri con 50 esclerocios, mezclados con 10 g de suelo, a las concentraciones 50, 75 y 100% (extracto en agua). Se determinó la eficiencia sobre la germinación de los esclerocios y la viabilidad de los recuperados, no germinados, ambos a los 30 y 60 días. El extracto de puerro disminuyó el porcentaje de esclerocios recuperados. Con extracto al 100% y 75% germinaron un 32-38,5% y 31,5-35,5%, respectivamente, de los esclerocios en los dos tiempos evaluados, y valores menores se encontraron con extracto al 50%. La viabilidad de los esclerocios recuperados disminuyó entre 66,5 y 54,5%, para el extracto al 100%, y entre 68,5% y 51,5% para el extracto al 75%, a los 30 y 60 días, respectivamente. La supervivencia de los esclerocios disminuyó por la estimulación de la germinación y por la pérdida de viabilidad luego de aplicados los extractos.

**Palabras clave:** extracto de puerro, control, *Sclerotium cepivorum*

Argüello, E.; V. Yossen, E. Lucini and M. Conles, 2009. Effect of leek extract (*Allium porrum* L.) on the survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. Agriscientia XXVI (1): 23-27

## SUMMARY

The use of sclerotial germination stimulants of *Sclerotium cepivorum* prior to crop planting is an alternative for the management of the disease. In the present work, we evaluated the effect of leek extract (*Allium porrum* L.) on the survival of sclerotia of *S. cepivorum*. Aqueous leek extract at concentrations of 50, 75 and 100% were placed in Petri dishes containing 50 sclerotia mixed with 10 g soil. Both the

efficacy of the extract on sclerotia germination and the viability of recovered ungerminated sclerotia were determined after 30 and 60 days. Leek extract reduced the percentage of recovered sclerotia in all cases. Percentages of germinated sclerotia ranged from 32 to 38.5% and from 31.5% to 35.5% at 100% and 75% extract concentration respectively, at each of the two times studied. Lower values were obtained at 50% extract concentration. Viability of recovered sclerotia decreased between 66.5 and 54.5% at 100% extract concentrations and between 68.5 and 51.5% at 75% extract concentrations after 30 and 60 days, respectively. Sclerotial pathogen survival decreased by the germination stimulation and by the loss of viability after the application of the extracts.

**Key words:** leek extract, control, *Sclerotium cepivorum*.

*E. Argüello, V. Yossen, E. Lucini y M. Conles. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC. CC 509. 5000 Córdoba, Argentina. Correspondencia a V. Yossen: viyossen@agro.unc.edu.ar*

*Sclerotium cepivorum* es el causal de la podredumbre blanca del ajo y la cebolla, enfermedad específica del género *Allium*. Los cultivares de puerro (*A. porrum* L.) son menos susceptibles que los de cebolla (*A. cepa* L.), ajo (*A. sativum* L.) y *Allium fistulosum* L. (Coley-Smith & Esler, 1983). La podredumbre blanca es una enfermedad limitante de la producción en los cultivos de ajo y cebolla en todo el mundo, con pérdidas de hasta el 100%. Su rápida diseminación, principalmente por labores de labranza y el agua de riego, ha obligado a los agricultores a cambiar de cultivo en forma definitiva.

La enfermedad afecta a las plantas en cualquier estado de desarrollo. Las plantas infectadas pueden morir desde la emergencia, durante el cultivo y cuando la infección ocurre tarde, aparece en el almacenamiento (Entwhistle, 1990; Crowe, 1996; Agrios, 2004).

Argentina se encuentra entre los 10 principales países productores de ajo del mundo. El 75% de la producción total de ajo se exporta (Trapé y Pereyra, 2003). En la provincia de Córdoba este cultivo contribuye al sostenimiento de economías regionales por la alta demanda de mano de obra, porque se cosecha en una época de altos precios internos y por sus posibilidades de exportación.

El control químico de la enfermedad es poco efectivo debido a su ineficacia para controlar los esclerocios o inóculo primario, y a la dificultad para proteger los sitios de infección, en las raíces. Además, los productos se degradan rápidamente en el suelo (Coley-Smith, 1990; Zewide *et al.*, 2007).

La rotación de cultivos no es posible por la longevidad de los esclerocios en el suelo, y no existen variedades resistentes al patógeno (Coley-Smith, 1990).

La falta de un control eficaz y económico obliga a la búsqueda de otras alternativas de cultivos para la zona.

Como una alternativa al manejo tradicional de la enfermedad se han utilizado estimulantes naturales y artificiales de la germinación de los esclerocios, ya que solamente germinan ante la presencia de estimulantes producidos por los exudados de las raíces de las especies de *Allium* (Coley-Smith & King, 1969). Pero aún es escasa la información sobre el efecto de estimulantes naturales de puerro sobre la germinación de esclerocios del patógeno en suelos de Córdoba.

Los esclerocios recién formados poseen un período de dormancia constitutiva de 1-3 meses, durante el cual no responden a los estimulantes de la germinación (Coley-Smith, 1960). Los exudados están compuestos por sustancias no volátiles de sulfóxidos de alquil y alquenil-cisteína, los que son metabolizados por la microflora del suelo, especialmente por bacterias en la rizosfera, para producir compuestos volátiles, como el di-N-propil disulfuro (DPDS) y el diallil disulfuro (DADS), activadores de la germinación. Coley-Smith (1960) y Coley-Smith & King (1969) demostraron la presencia de un gran número de compuestos sulfurados que estimulan la germinación de los esclerocios en todas las especies del género *Allium*. Una alta actividad fue confirmada con los mercaptanos y monosulfuros que

poseen radical n-propilo o alilil. Sin embargo, consideran que existen otros compuestos volátiles, que no pudieron ser detectados en los destilados de aliáceas por cromatografía gaseosa, que estimulan la germinación de los esclerocios.

Cuando el suelo es tratado con estos estimulantes, en ausencia del hospedante, el esclerocio sufre inanición, antagonismo, lisis y predación. Hovius & McDonald (2002) observaron que la supervivencia de los esclerocios disminuía con la incorporación al suelo de DADS y DPDS sintéticos, derivados del petróleo. Merriman *et al.* (1980) también observaron el mismo efecto con aceite esencial de cebolla, incorporado al suelo antes de la siembra. Somerville & Hall (1987) reportaron que extractos de diferentes especies de *Allium* aplicados al suelo estimularon la germinación de los esclerocios y su posterior muerte, y que la aplicación de DADS al suelo redujo la incidencia de la enfermedad. Con dos aplicaciones de DADS, en años consecutivos, no se recuperaron esclerocios viables del patógeno.

Con la finalidad de encontrar una medida eficaz y económica para disminuir el inóculo del patógeno en Córdoba, el objetivo del trabajo fue determinar el efecto de un extracto de puerro sobre la supervivencia de los esclerocios de *S. cepivorum*.

En los ensayos se utilizaron esclerocios producidos en laboratorio, a partir de un aislamiento del patógeno proveniente de plantas de ajo enfermas. Se cultivaron según la técnica propuesta por Coley-Smith (1985). Para romper la dormancia constitutiva de los esclerocios se enterraron en bolsas de nylon con suelo durante 60 días. Antes de su utilización en los ensayos se recuperaron por medio de tamizado húmedo (Adams, 1979)

Se utilizaron 500 g de hojas de puerro con las cuales se obtuvieron 500 ml de extracto destilado. Los compuestos volátiles se separaron por medio de una hidro-destilación usando un aparato Clevenger type (Singh *et al.*, 2002). Posteriormente el extracto fue analizado por cromatografía gaseosa en un equipo Shimadzu GC-R1. Los constituyentes del extracto de puerro fueron identificados por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (CG-EM) con un equipo Perkin Elmer Q-700 equipado con una columna capilar. Se utilizó una columna polar, Supelcowax 10 (30 m x 0,25 mm), y luego una columna apolar, DB-5 (30 m x 0,25 mm), mantenidas a 60 °C durante 3 minutos, para luego incrementar 4 °C/minuto hasta alcanzar los 240 °C. El inyector se colocó a 250 °C. Se usó helio como gas transportador a un caudal de 0,9 ml/minuto. El espectro de masas se obtuvo a un voltaje de ionización de 70 eV. La identificación de los compuestos se realizó mediante la base de datos NIST, versión 3.0,

(Adams, 1989).

En cajas de Petri se colocaron 50 esclerocios mezclados con 10 g de suelo y se agregaron 10 ml de extracto destilado por caja. Pevio a su colocación, los esclerocios se desinfectaron con hipoclorito de sodio 0,6% durante tres minutos. Suelo no esterilizado proveniente de lotes que nunca fueron cultivados con ajo se regó con extracto de puerro al 50, 75 y 100% (extracto/agua destilada). Se evaluó el efecto de los extractos sobre la supervivencia de los esclerocios a los 30 y 60 días, en incubadora a 20 ± 1 °C). Los esclerocios que no germinaron como respuesta a la estimulación del extracto de puerro fueron recuperados por tamizado húmedo (Adams, 1979), y este valor se registró como el porcentaje de esclerocios recuperados, en cada tratamiento. Posteriormente, se determinó la viabilidad (%) de los esclerocios recuperados en agar-agua 2%, pH 7, durante 7 días. Los ensayos se repitieron cuatro veces y el análisis estadístico de los datos se realizó por medio de un diseño factorial con los factores tiempo y porcentaje de extracto de puerro. Las diferencias en las medias de las variables esclerocios recuperados (%), germinados (%) y viabilidad (%) se determinaron por la prueba de LS, Fisher ( $p < 0,05$ ).

En el extracto de puerro se detectaron trazas (no cuantificables) de dialil disulfuro (DADS).

El porcentaje de esclerocios recuperados mostró significancia en la interacción de los factores tiempo y concentración de extracto ( $p=0,041$ ). La misma interacción fue altamente significativa para el porcentaje de esclerocios viables ( $p < 0,0001$ ).

En todos los casos, la adición del extracto de puerro afectó el porcentaje de esclerocios recuperados no germinados. Así, en los tratamientos con concentraciones de extracto de puerro al 75 y 100% se recuperaron los menores porcentajes de esclerocios, tanto a los 30 como a los 60 días. En consecuencia, el porcentaje de esclerocios considerados como germinados fueron los mayores a las mismas concentraciones y en los dos tiempos evaluados (Tabla 1) En los tratamientos con 50% de extracto de puerro germinó un menor número de esclerocios con respecto a las concentraciones más altas. Además, en esta concentración, el número de esclerocios germinados a los 30 y 60 días no difirió del tratamiento testigo.

La reducción en el porcentaje de esclerocios recuperados es considerada como un indicador de que parte de ellos germinó como respuesta al agregado del extracto de puerro con muy baja concentración de DADS. Coley-Smith & King (1969) consideran que existen otras sustancias volátiles y no volátiles, diferentes del DADS, en los extractos de aliáceas que están involucradas en la germinación de los

**Tabla 1.** Esclerocios de *Sclerotium cepivorum* recuperados, germinados, viables y no viables en los tratamientos con extracto de puerro y en dos tiempos de exposición.

Extracto de puerro	Tiempo de exposición (días)	Esclerocios recuperados *	Esclerocios germinados *	Esclerocios viables *	Esclerocios no viables *
50	30	88,00 cd	12,00 cd	77,50 d	22,50 d
	60	83,00 cd	17,00 cd	52,50 c	47,50 c
75	30	68,50 ab	31,50 ab	31,50 a	68,50 a
	60	64,50 a	35,50 a	48,50 bc	51,50 bc
100	30	68,00 ab	32,00 ab	33,50 a	66,50 a
	60	61,50 a	38,50 a	45,50 b	54,50 b
Testigo (sin extracto)	30	93,00 d	7,00 d	94,00 e	6,00 e
	60	83,00 cd	17,00 cd	90,50 e	9,50 e

\* Los valores corresponden a la media de cuatro repeticiones por tratamiento, en porcentaje.

Letras distintas en las columnas correspondientes a cada variable, indican diferencias significativas; Test LSD ( $p > 0,05$ ).

esclerocios. Estas sustancias no fueron detectadas con cromatógrafos de alta sensibilidad, aunque consideran que deberían ser investigadas. Esler y Coley-Smith (1983) determinaron que no había diferencias cuantitativas en la germinación de los esclerocios del patógeno cuando comparaban extracto de ajo, cebolla y puerro, y que sólo seis especies ornamentales de *Allium* mostraron una pequeña o ninguna capacidad para estimular la germinación de los esclerocios del patógeno. En ensayos de laboratorio, Coley-Smith (1986) determinó que el 50% de los esclerocios germinaron a los 2 meses cuando estuvieron en contacto con plántulas de cebolla y entre 2 y 4 meses con plántulas de puerro. En este trabajo las evaluaciones sobre los esclerocios del patógeno, luego del agregado del extracto de puerro, se realizaron solamente hasta los 2 meses del ensayo. En este período no se evidenciaron diferencias significativas en el porcentaje de esclerocios recuperados a los 30 y 60 días de exposición al extracto. Los menores porcentajes de esclerocios recuperados viables se encontraron a los 30 y 60 días, cuando se adicionó extracto al 75 y 100%. En consecuencia, en estas concentraciones y en los dos tiempos evaluados, el porcentaje de los esclerocios no viables fue el mayor (Tabla 1).

También se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la viabilidad de los esclerocios en el tratamiento con 50% de extracto de puerro en agua, pero menor a las obtenidas con concentraciones del 75 y 100% de extracto (Tabla 1).

En extractos realizados a partir de dientes de ajo se obtuvieron concentraciones de DADS de aproximadamente el 50% del líquido total (Lucini, 2007, observación personal), pero en el extracto de puerro, sólo se detectaron trazas de estos compuestos. Aún así, los extractos indujeron la germinación y disminuyeron su viabilidad.

Merriman *et al.* (1980) controlaron la enfermedad en un 91% cuando adicionaron aceite de cebolla al

suelo 30 días antes de la siembra. También, Somerville & Hall (1987), determinaron que extractos de diferentes especies de *Allium* aplicados al suelo 45 días antes de la siembra, estimularon la germinación de un 60% de esclerocios. En este trabajo la proporción de esclerocios que germinaron como respuesta a los estimuladores, en igual período de exposición a los extractos, fue menor que la encontrada por dichos autores. Sin embargo, cuando se evaluó la viabilidad de los esclerocios recuperados se observó que la supervivencia de los esclerocios se redujo aún más. Así, el efecto sobre la supervivencia de los esclerocios en el suelo se determinó por medio del porcentaje de esclerocios germinados en respuesta a la inducción de los estimulantes, y también por la pérdida de viabilidad de los esclerocios no germinados.

Hovius & McDonald (2002) consideraron importante una disminución de la supervivencia de los esclerocios de un 15 % cuando aplicaron DADS y DPDS sintéticos en el mismo período de exposición a los extractos. En el presente trabajo se obtuvo una reducción en la supervivencia de los esclerocios mayor que la encontrada por estos autores.

Si bien Coley-Smith & King (1969) determinaron que la germinación de los esclerocios era más lenta y menor en presencia de extracto de puerro que con ajo, cebolla y la falsa cebolla, en los resultados obtenidos en esta investigación se observó que el extracto de puerro afectó en forma significativa la supervivencia de los esclerocios del patógeno. Es necesario realizar ensayos en cultivos de ajo en el campo, para poder determinar la factibilidad del uso de estos extractos en el manejo de la enfermedad.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Adams, P.B., 1979. A rapid method for quantitative isolation of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *Sclerotium cepivorum* from soil. *Plant Disease Reporter* 63: 349-351.
- Adams, R.P., 1989. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic Press, California, 302 pp.
- Agrios, G.N., 2004. Fitopatología. Ed. Limusa, México, 838 pp.
- Coley-Smith, J.R., 1960. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. IV. Germination of sclerotia. *Annals of Applied Biology* 48 (1): 8-18.
- Coley-Smith, J.R., 1985. Methods for the production and use of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in field germination studies. *Plant Pathology* 34:380-384.
- Coley-Smith, J.R., 1986. Interactions between *Sclerotium cepivorum* and cultivars of onion, leek, garlic and *Allium fistulosum*. *Plant Pathology* 35: 362-369.
- Coley-Smith, J.R., 1990. White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. *Plant Pathology* 39: 214-222.
- Coley-Smith, J.R. and G. Esler, 1983. Infection of cultivars of onion, leek, garlic and *Allium fistulosum* by *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathology* 32: 373-376.
- Coley-Smith, J.R. and J.E. King, 1969. The production by species of *Allium* of alkyl sulphides and their effects on the germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Annals of Applied Biology* 64: 289-301.
- Crowe, F.J., 1996. White rot. In *Compendium of Onion and Garlic Diseases*, (eds.). Schwartz, H. F. and Mohan, S. K., APS Press, USA, pp. 14-16.
- Entwistle, A.R., 1990. *Allium* white rot and its control. *Soil Use Management* 6: 201-209.
- Esler, G. and J.R. Coley-Smith, 1983. Flavour and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathology* 32: 13-22
- Hovius, M.H.Y. and M.R. McDonald, 2002. Management of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) in onions on organic soil with soil-applied diallyl disulphide and di-N-propyl disulphide. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 24: 281-286.
- Merriman, P.R.; S Isaacs; R.B. MacGregor and G.B. Towers, 1980. The evaluation of onion oils as a treatment for the control of *Sclerotium cepivorum* in onions. *Annals of Applied Biology* 96: 163-168
- Singh, G., Singh, O.P. and S. Maurya, 2002. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. 45: (1) 75 - 81.
- Somerville, P. A. and Hall, D.H. 1987. Factors affecting sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*, secondary sclerotia formation, and germination stimulants to reduce inoculum density. *Plant Disease* 71(3): 229-233
- Trapé, A y Pereyra M. 2003. Situación actual de ajo, Informe preliminar 2003 – 2004. Serie de informes de coyuntura. Instituto de Desarrollo Rural, Ministerio de Economía, Gobierno de Mendoza, Argentina, 22 pp.
- Zewide, T; Fininsa, C. and Sakhuja, P.K. 2007. Management of white rot (*Sclerotium cepivorum*) of garlic using fungicides in Ethiopia. *Crop Protection* 26 (6): 856 – 866.