

EFFECTOS DE EXTRACTOS DE UNA CIANÓFITA (*Nostoc muscorum*) SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum* EN PLÁNTULAS DE LECHUGA

C.A. TASSARA¹; MARÍA V. LÓPEZ² y E.R. WRIGHT³

Recibido: 11/12/99

Aceptado: 15/09/00

RESUMEN

Sclerotinia sclerotiorum puede causar importantes pérdidas en cultivos de lechuga. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de extractos etéreos y acuosos de un cultivo del alga *Nostoc muscorum* sobre plántulas de lechuga inoculadas con *Sclerotinia sclerotiorum* en cámaras de cultivo. El extracto algal etéreo aplicado sobre el tallo de las plántulas retardó la expresión de los síntomas producidos. No se encontraron diferencias significativas con la aplicación de extractos acuosos.

Palabras clave. *Sclerotinia sclerotiorum*-*Nostoc muscorum*-extracto algal etéreo-extracto algal acuoso-lechuga.

EFFECTS OF EXTRACTS FROM A CYANOPHYTA (*Nostoc muscorum*) ON *Sclerotinia sclerotiorum* IN LETTUCE SEEDLINGS

SUMMARY

Sclerotinia sclerotiorum may cause important losses in lettuce croppings. The aim of the present research was to evaluate the effect of ether and aqueous extracts from a culture of *Nostoc muscorum* on *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce seedlings in culture chambers. The ether algal extract placed on the plant stalks retarded the expression of the symptoms produced. No significant differences were found with the application of the aqueous extract.

Key words. *Sclerotinia sclerotiorum*-*Nostoc muscorum*-ether algal extract aqueous algal extract -lettuce.

INTRODUCCIÓN

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) D By se encuentra entre los organismos fitopatógenos más polífagos (Adams y Tate, 1975). Puede causar importantes pérdidas en cultivos de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Fue citado en este cultivo en la República Argentina por Carrera *et al.*, (1942) y Rodríguez Landaeta (1944) mencionados por Carranza (1975).

Desde 1981, un grupo de investigadores de la Universidad de Hawai, con colegas de otras instituciones, han descubierto nuevos compuestos de interés farmacéutico a partir de cianobacterias. Para este fin, evaluaron la actividad hidrofílica y lipofílica de extractos de más de 1500 cepas, que representa aproximadamente 400 especies de cianobacterias (Patterson, 1994, citado por Kulik, 1995). La actividad

antifúngica y antiviral se ha observado en gran número de estos extractos (Kulik, 1995).

La inhibición in vitro del crecimiento vegetativo de *Sclerotinia sclerotiorum*, fue detectada en extractos acuosos y etéreos, de productos celulares y extracelulares, obtenidos a partir del cultivo de una cepa de *Nostoc muscorum*. (Caire *et al.*, 1987).

La mayor inhibición se observó con productos extracelulares de este procarionte. Un trabajo previo demostró la capacidad antifúngica de esta cianófita sobre *Rhizoctonia solani* (Caire *et al.*, 1990).

En este trabajo, se estudió el efecto antagónico de productos extracelulares de *Nostoc muscorum*, sobre plántulas de lechuga inoculadas con *Sclerotinia sclerotiorum*.

¹Cátedra de Seminario de Campo II, ²Cátedra de Estadística y ³Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín 4453 (1417). Buenos Aires. Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El alga utilizada fue la cepa 79a de *Nostoc muscorum*, obtenida de arrozales argentinos (Entre Ríos, Concepción del Uruguay, D.R. Halperín y R. Diéguez; 20 - XII - 1996). El patógeno inoculado fue *Sclerotinia sclerotiorum*, aislado de cultivos de lechuga existentes en el cinturón hortícola en el partido de Marcos Paz. Se utilizaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) variedad capitata, subvariedad gallega (Semillas Raffo S.A.).

Las condiciones de axenidad de algas se lograron con luz ultravioleta, con 60 minutos de irradiación (Halperín *et al.*, 1973) luego se cultivaron durante 12 meses en medio Watanabe modificado (Halperín *et al.*, 1973) con tubos fluorescentes de 40 W.

Se realizaron 2 ensayos, con plantas que tenían 15 días en almácigo y 15 días en macetas de 350 cm³. Las condiciones ambientales se mantuvieron a una humedad relativa del 90%, una temperatura promedio de 18°C, un fotoperíodo de 12 horas, una intensidad de luz de 450 microeinsteins/cm² .seg⁻¹ (medido con un radiómetro LICOR L-1000 con dataloguer) y se regaron con 35 ml de agua destilada cada 2 días.

El sustrato fue obtenido de la capa superficial de un Argiudol típico del Partido de Marcos Paz, correspondiente al cinturón hortícola de Buenos Aires (Tassara *et al.*, 1998).

En el primer ensayo los tratamientos fueron los siguientes:

- Planta testigo.
- Planta inoculada.
- Planta inoculada + aplicación de extracto etéreo.
- Planta inoculada + aplicación de extracto acuoso.
- Planta inoculada + aplicación de medio Watanabe.

El hongo se cultivó en agar papa glucosado y se repicó a los 10 días a erlenmeyers con arroz estéril. Se utilizó como inóculo la masa hifal formada superficialmente sobre el arroz, la que se ubicó rodeando el cuello de la planta a 3 milímetros de distancia (Tassara *et al.*, 1998). Los extractos y el medio estéril fueron posteriormente pipeteados sobre el patógeno.

El extracto etéreo transferido a agua se logró pesando 8 g de masa algal fresca, previamente centrifugada durante 15 minutos a 4500 rpm, moliéndola luego en mortero con arena tratada y agregando pequeñas alícuotas de éter desperoxidado (Werner, 1933, citado por Caire *et al.*, 1976) hasta completar 80 ml. Luego de evaporado el éter se transfirió a 80 ml de agua y se filtró en filtros de nitrocelulosa de poros de 0,22 micrones (Mulé *et al.*, 1991). El extracto acuoso se obtuvo de la misma forma que el extracto etéreo, utilizando agua destilada estéril en vez de éter desperoxidado (Mulé *et*

al., 1991). Cuando se agregó a las plantas medio de cultivo Watanabe modificado, se utilizó el medio donde las algas habían desarrollado durante 12 meses (Halperín *et al.*, 1973). El pH del medio algal fue de 8,1; su densidad óptica 5,4 de absorvancia; y su peso seco de 6,2 mg/ml.

El número de plantas fue 50 (capacidad máxima de la cámara de cultivo). Las plantas en el momento de la doble inoculación, tenían 30 días, con 7 a 8 hojas expandidas. Se realizaron 10 repeticiones para cada tratamiento y se pipetearon 1,5 ml de extracto o medio sobre el cuello de las plantas.

En el segundo ensayo se eligió la solución de mejor respuesta, elevando la dosis del primer ensayo al doble y esperando una mayor acción antagonica.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- Planta testigo.
- Planta inoculada.
- Planta inoculada + extracto etéreo sin alga.
- Planta inoculada + extracto etéreo con alga.

El número total de plantas fue 44, con 11 repeticiones. El tratamiento 3 fue realizado como control del tratamiento 4. Durante ambos ensayos los tratamientos se colocaron al azar en la cámara de cultivo. Las observaciones para los 2 ensayos se realizaron a los 8 y 12 días de la inoculación. Se utilizó la transformación de arcoseno de las proporciones de plantas caídas en el test de hipótesis y procedimientos de estimación de intervalos asociados con la igualdad de proporciones sugeridos por Cohen (1967), citado por Marscuillo y Mc Sweeney, (1977). Sin embargo, los resultados se presentan en las unidades originales para facilitar la interpretación. Para cada tratamiento se calculó el intervalo de confianza binomial exacto para la proporción de plantas caídas (Sachs, 1984).

RESULTADOS

En los Cuadros N° 1 y 2 se transcriben los resultados obtenidos del primer ensayo con observaciones a los 8 y 12 días de la inoculación, respectivamente.

En los cuadros N° 3 y 4 se transcriben los resultados obtenidos a partir del segundo ensayo, con observaciones a los 8 y 12 días de la inoculación.

Se detectaron diferencias entre tratamientos en la proporción de plantas caídas para ambos ensayos ($U = 50,3$ $p < 0,001$). A los ocho días el grupo formado por el testigo y el tratamiento con algas

Cuadro N° 1. Número de plantas caídas a los ocho días de la inoculación en el primer ensayo.

Tratamiento	Número de plantas caídas	Proporción estimada de plantas caídas (%)	LCI% (a)	LCS% (b)
Testigo	0	0	0	30,85
Planta inoculada	10	100	69,15	100
Planta inoculada más extracto etéreo	5	50	18,71	81,29
Planta inoculada más extracto acuoso	10	100	69,15	100
Planta inoculada más medio de cultivo	10	100	69,15	100

(a) LCI% límite inferior, en porcentaje, del intervalo del 95% de confianza para la proporción de plantas caídas.

(b) LCS% límite superior, en porcentaje, del intervalo del 95% de confianza para la proporción de plantas caídas.

Cuadro N° 2. Número de plantas caídas a los doce días de la inoculación en el primer ensayo.

Tratamiento	Número de plantas caídas	Proporción estimada de plantas caídas (%)	LCI% (a)	LCS% (b)
Testigo	0	0	0	30,85
Planta inoculada	10	100	69,15	100
Planta inoculada más extracto etéreo	10	100	69,15	100
Planta inoculada más extracto acuoso	10	100	69,15	100
Planta inoculada más medio de cultivo	10	100	69,15	100

(a) LCI % límite inferior, en porcentaje, del intervalo del 95% de confianza para la proporción de plantas caídas.

(b) LCS % límite superior, en porcentaje, del intervalo del 95% de confianza para la proporción de plantas caídas.

Cuadro N° 3. Número de plantas caídas a los ocho días de la inoculación en el segundo ensayo.

Tratamiento	Número de plantas caídas	Proporción estimada de plantas caídas (%)	LCI% (a)	LCS% (b)
Testigo	0	0	0	28,49
Planta inoculada	9	81,82	48,22	97,72
Planta inoculada más extracto etéreo sin algas	11	100	71,51	100,00
Planta inoculada más extracto etéreo más algas	3	27,27	6,02	60,97

(a) LCI % límite inferior, en porcentaje, del intervalo del 95% de confianza para la proporción de plantas caídas.

(b) LCS % límite superior, en porcentaje, del intervalo del 95% de confianza para la proporción de plantas caídas.

Cuadro N° 4. Número de plantas caídas a los doce días de la inoculación en el segundo ensayo.

Número de Tratamiento	Proporción plantas caídas	Proporción estimada de plantas caídas (%)	LCI% (a)	LCS% (b)
Testigo	0	0	0	30,85
Planta inoculada	10	90,91	58,72	99,97
Planta inoculada más extracto etéreo sin algas	11	100	71,51	100
Planta inoculada más extracto etéreo más algas	7	63,64	30,79	89,09

(a) LCI % límite inferior, en porcentaje, del intervalo del 95% de confianza para la proporción de plantas caídas.

(b) LCS % límite superior, en porcentaje, del intervalo del 95% de confianza para la proporción de plantas caídas.

difirieron significativamente del grupo del resto de los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas dentro de los grupos. Se debe notar que la superposición de los intervalos individuales no debe ser vista como una prueba de diferencias no significativas (Nelson, 1989). A los doce días murieron todas las plantas inoculadas, sin verificarse plantas caídas en el testigo sin patógeno.

En el segundo ensayo los resultados obtenidos a los ocho y doce días fueron similares, observándose diferencias significativas entre los tratamientos en ambos momentos ($U = 42,9$ $p < 0,001$ y $U = 42,1$ $p < 0,001$ para ocho y doce días respectivamente). El grupo formado por el control y el tratamiento con algas difirieron significativamente del grupo con el resto de los tratamientos. No se pudieron detectar diferencias dentro de los grupos. Sin embargo, a los doce días, comparando el tratamiento con algas con los otros dos con patógeno, no pudieron detectarse diferencias significativas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Extractos etéreos de la alga *Nostoc muscorum* ubicados sobre el tallo de plantas de lechuga retrasaron la manifestación de los síntomas producidos por *Sclerotinia sclerotiorum*. No se encontraron diferencias significativas con la aplicación de extractos acuosos. Mulé *et al.*, (1991) encontraron inhibición en el desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum* «in vitro» a los 3 días con extractos metabólicos y productos extracelulares de cultivos de la alga *Nostoc muscorum* aislamiento 79, con rápida recuperación a los 11 días. Una tendencia similar fue observada en el presente ensayo. Son necesarios otros estudios para evaluar el efecto de extractos algales etéreos de *N. muscorum* en condiciones de campo. Si los resultados obtenidos en los estudios en cámara climática se confirman en condiciones de campo la aplicación de dichos extractos podría constituir una herramienta de control para ser aplicada en el marco de un manejo integrado de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, D.B. and C.J. TATE. 1975. Factors affecting lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. Rep. 15 (1): 140-143.
- CAIRE, G.Z. de; de CANO M.S.; de MULÉ M.C.Z.; de HALPERÍN D.R. y M. GALVAGNO, 1987. Action of cell-free extracts and extracellular products of *Nostoc muscorum* on growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytion 48 (1/2): 43-46.
- CAIRE, G.Z. de; de CANO, M.S.; de MULÉ M.C.Z. y de HALPERÍN D.R.. 1990. Antimycotic products from the Cyanobacterium *Nostoc muscorum* against *Rhizoctonia solani*. Phytion 51 (1): 1-4.
- CAIRE, G.Z. de; de MULÉ M.C.Z.; S. OALLO; de HALPERÍN D.R. y L. HALPERÍN. 1976. Acción de extractos algales acuosos y etéreos de *Nostoc muscorum* AG (Nº 79 a). Efecto sobre plántulas de mijo (*Panicum miliaceum* L.) mediante tratamiento de sus semillas. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 17 (3-4): 289-300.
- CARRANZA, J.M. 1975. Lista de principales casas de enfermedades de los cultivos hortícolas en la República Argentina. Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Plata, 58 pp.
- COHEN, J. 1967. An Alternative to arascuillo's «Large sample multiple comparisons» for proportions. Psychological Bulletin, 67:199-201.
- HALPERÍN, D.R. DE; MENDOZA, M.L. y CAIRE, G.Z. DE. 1973. Otención de cultivos axénicos de algas azules (Cyanophyta). Physis 84: 67-84.
- KULIK, M.M. 1995 The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. European Journal of Plant Pathology 101: 585-599.
- MARASCUILLO, L. and M. MC. SWEENEY. 1977. Nonparametric and Distribution-Free Methods for the Social Sciences. Brooks Cole Monterrey, California, pp. 147-151.
- MULÉ, M.C.Z. DE; CAIRE, G.Z. DE; CANO, M.S. DE y HALPERÍN, D.R. DE. 1991. Bioactive compounds from *Nostoc muscorum* (Cyanobacteria). Cytobios 66 169-172.
- NELSON, L.S. 1989. Evaluating Overlapping Confidence Intervals. Journal of Quality Technology 21 (2): 140-141.
- SACHS, L. 1984. Applied Statistics. Second Edition. Springer Verlag, p.:333.
- TASSARA, C.A.; M.V. LÓPEZ y E.R. WRIGHT. 1998. Nivel crítico de distancia y peso de micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* para producir infección y caída de plantas de lechuga en cámara de cultivo. Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, 18 (1-2): 85-88.