

# Potencial biofumigante *in vitro* de tres especies de Brassicaceae para el manejo de fitopatógenos de suelo



## *In vitro* biofumigant potential of three species of Brassicaceae for soil phytopathogen management

<https://eqrcode.co/a/ZPyjhY>

✉ Verónica Toledo Sampedro<sup>1\*</sup>, ✉ Javier Martínez Pacheco<sup>1</sup>,  
✉ Angélica de la C. González Toledo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones del Tabaco, San Antonio de los Baños, Artemisa, Cuba.

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

**RESUMEN:** El objetivo de esta investigación fue evaluar, *in vitro*, el efecto biofumigante de especies de la familia Brassicaceae sobre el crecimiento micelial de fitopatógenos en el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Se evaluaron tres especies: *Brassica juncea* L. (mostaza india), *Brassica oleracea* var. *acephala* L. (berza) y *Sinapis alba* L. (mostaza blanca), que fueron testadas frente a siete aislamientos (número entre paréntesis) de: *Phytophthora nicotianae* (2), *Fusarium oxysporum* (2), *Fusarium solani* (2), y *Rhizoctonia solani* (1). Las especies vegetales, a concentración de 2,5 g/L y 5 g/L de capacidad del contenedor (20 L), se trituraron y colocaron en vasos de precipitado con 600 ml de agua destilada. Como cámara de incubación, se utilizaron contenedores de 20 L en los cuales se colocaron las placas Petri, sin tapas, de todos los aislamientos por triplicado y, en el centro, el vaso de precipitado con el agua destilada y el material vegetal. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de cada aislamiento transcurrido siete días de incubación (27°C, oscuridad). Para determinar la viabilidad de los aislamientos, después de los tratamientos con cada uno de los biofumigantes, los discos de micelio se transfirieron a medio de cultivo Papa Dextrosa Agar. El incremento de la concentración de las especies *B. juncea*, *B. oleracea* y *S. alba* a 5 g/L aumentó el porcentaje de inhibición del crecimiento *in vitro* de los aislamientos de *P. nicotianae*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*. Excepto para el aislamiento de *R. solani*, los resultados mostraron que *B. juncea*, *B. oleracea* y *S. alba* poseen potencialidades fungistáticas a concentraciones de 5 g/L.

**Palabras clave:** tabaco, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, fungistasis.

**ABSTRACT:** The objective of this research was to evaluate the *in vitro* biofumigant effect of species of the family Brassicaceae on mycelial growth of phytopathogens in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Three species were evaluated: *Brassica juncea* L. (Indian mustard), *B. oleracea* var. *acephala* L. (cabbage) and *Sinapis alba* L. (white mustard), which were tested against seven isolates (in parenthesis): *Phytophthora nicotianae* (2), *Fusarium oxysporum* (2), *Fusarium solani* (2), and *Rhizoctonia solani* (1). The Brassicas species, at a concentration of 2.5 g/L and 5 g/L container capacity (20 L), were crushed and placed in beakers with 600 mL of distilled water. Containers of 20 L were used as incubation chamber, in which the Petri dishes, without the lids, of all the isolates were placed in triplicate, and in the center, the beaker with distilled water and the plant material. The percentage of mycelial growth inhibition of each isolate was determined 7 days after incubating the containers at 27°C in the dark. To determine viability of the isolates after the treatments with each of the biofumigants, the mycelium discs were transferred to fresh potato dextrose agar culture medium. Concentration increase of the species *B. juncea*, *B. oleracea*, and *S. alba* to 5 g/L, increased the percentage of the *in vitro* growth inhibition of *P. nicotianae*, *F. oxysporum*, *F. solani* and *R. solani* isolates. Except for the isolate of *R. solani*, the results obtained showed that *B. juncea*, *B. oleracea* and *S. alba* had fungistatic potentialities at concentrations of 5 g/L.

**Key words:** tobacco, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, fungistasis.

\*Autor para correspondencia: Verónica Toledo Sampedro. E-mail: [biologia@iitabaco.co.cu](mailto:biologia@iitabaco.co.cu)

Recibido: 31/07/2020

Aceptado: 29/09/2020

## INTRODUCCIÓN

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) constituye el cuarto renglón económico exportable de la economía cubana y acumula una tradición productiva de gran prestigio internacional. Múltiples son las enfermedades provocadas por microorganismos de suelo que afectan al cultivo del tabaco, no solo en Cuba, sino en el resto de las áreas tabacaleras en el mundo. Entre ellas se destaca, por su importancia económica, la enfermedad pata prieta o podredumbre del cuello, causada por el oomicetes, *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Otra de las enfermedades del cultivo es el marchitamiento por *Fusarium* provocado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *nicotianae* (Johnson) Synd. & Hans. La misma es muy frecuente en etapa de semillero y puede aparecer asociada a *P. nicotianae* y a *Rhizoctonia solani*, Kühn (1).

Para disminuir el impacto de las enfermedades se aplica una estrategia integral que involucra el desarrollo y el uso de cultivares resistentes, aplicación de fungicidas químicos, rotación de cultivos, entre otros métodos de control (2). En Cuba, para el manejo de las enfermedades del suelo en el tabaco, se emplea el control biológico mediante la adición al suelo de cepas de *Trichoderma harzianum* Rifai (3). Para combatir a los fitopatógenos, las alternativas con productos naturales cobran cada vez más importancia, por sus bajos costos e inocuidad al medio ambiente, en comparación con el control químico. En este contexto, la biofumigación se presenta como una posible alternativa de manejo y se basa en la actividad biocida de compuestos volátiles (isotiocianatos, nitrilos, etc.) liberados tras la hidrólisis de los glucosinolatos (GSLs), metabolitos secundarios producidos por especies de la familia Brassicaceae (4).

Numerosas especies de esta familia, como *Brassica carinata* Braun, *Brassica juncea* L., *Brassica nigra* Koch, *Brassica oleracea* L. y *Sinapis alba* L., se han empleado como biofumigantes para la protección de diversos cultivos (5). Las especies *S. alba* y *B. juncea* son típicas de climas templados, pero algunas variedades de estas especies se han tropicalizado en Cuba con resultados positivos.

Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto biofumigante de *B. juncea*, *B. oleracea* y *S. alba* sobre el crecimiento micelial de aislamientos de *P. nicotianae*, *F. oxysporum* y *R. solani* provenientes de plantas enfermas de tabaco.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal biofumigante

Las semillas certificadas, mostaza blanca (*Sinapis alba* L. cv. INIFAT 114), mostaza india (*Brassica juncea* (L.) Czern. cv. Tropical-5) y berza (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* cv G-9), se obtuvieron del Banco de Semillas del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Cuba. Las semillas se plantaron en parcelas de 2 m<sup>2</sup> y se cubrieron con un cobertor de tela para semillero de tabaco hasta los siete días después de su germinación. Las parcelas se regaron dos veces al día durante 10 min para mantener siempre la humedad del sustrato, el cual estuvo conformado por cachaza, zeolita y paja de arroz.

Para garantizar la cantidad de biomasa necesaria, la cosecha se realizó manualmente cuando más del 50 % de las plantas se encontraron en su estado de floración. Inmediatamente después, las hojas y los tallos de las plantas se lavaron con agua común, se agruparon por especies y se almacenaron a una temperatura de -30°C hasta su posterior uso.

### Aislamientos fitopatogénicos

Se utilizaron cuatro microorganismos fitopatógenos: *Phytophthora nicotianae* (2), *Fusarium oxysporum* (2), *Fusarium solani* (2) y *Rhizoctonia solani* (1). Todos los aislamientos se obtuvieron de las raíces enfermas de plantas adultas de tabaco en diferentes zonas del cultivo, en Cuba y pertenecientes a la colección del Laboratorio de Micología del Instituto de Investigaciones del Tabaco (Tabla 1). Para la obtención de los preinóculos de los microorganismos, los aislamientos se conservaron en medio de cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA), por un periodo de siete días. Trascorrido este tiempo, se cortaron discos

**Tabla 1.** Aislamientos patogénicos de plantas de tabaco utilizados en los ensayos/ *Pathogenic isolates of tobacco plants used in the trials*

Código <sup>1</sup>	Patógeno	Cultivar de <i>N. tabacum</i>	Lugar de origen
931	<i>P. nicotianae</i>	'Habana 92'	Provincia Pinar del Río
O1	<i>P. nicotianae</i>	'Corojo 2006'	Provincia Holguín
M 4	<i>F. solani</i>	'Criollo 98'	Pedro Betancourt, Matanzas
FP11	<i>F. solani</i>	'Criollo 98'	Pedro Betancourt, Matanzas
M 2	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>nicotianae</i>	'Burley BH-13'	Provincia Pinar del Río
FP10	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>nicotianae</i>	'Burley Pinar 2010'	Provincia Pinar del Río
TA 1015	<i>R. solani</i>	'Criollo 2010'	Provincia Artemisa

<sup>1</sup>Hace referencia a la identificación de los aislados en el Laboratorio de Micología, Instituto de Investigaciones del Tabaco, Cuba

de agar de 5 mm de diámetro con micelio crecido y se transfirieron al centro de placas Petri (90 mm) que contenían 25 ml de medio Papa Dextrosa Agar (PDA) para cada uno de los microorganismos en estudio.

Todas las placas se incubaron a 27°C durante 24 h antes de ser expuestas al material biofumigante para excluir la fase de adaptación (*lag*) y solo estimar las tasas de crecimiento lineal.

### Evaluación de la inhibición del material biofumigante sobre los aislados fitopatógenos

Para determinar el efecto supresor de las Brassicaceas sobre los aislamientos patogénicos, se trabajó independientemente cada material vegetal. Los órganos de las plantas (hojas y tallos) fueron triturados y removidos en vaso de precipitado el cual contenía 600 ml de agua destilada (6). Se utilizaron contenedores de 20 L de capacidad como cámara de incubación, en los cuales se colocaron las placas Petri, sin tapa, de todos los aislamientos por triplicados y, en el centro, el vaso de precipitado con el agua destilada y el material vegetal. Se evaluaron dos concentraciones 2,5 g/L y 5 g/L de cada material vegetal por capacidad del contenedor (20 L). Se consideró como control el contenedor que contenían los aislamientos y el vaso de precipitado solo con el agua destilada. A todos los contenedores se les colocaron las tapas y se sellaron con grasa de silicona para vacío y cinta adhesiva, para evitar el escape de los compuestos volátiles y el crecimiento de microorganismos contaminantes en las placas Petri. Los

contenedores se incubaron en la oscuridad a 27°C por un periodo de siete días. Pasado este tiempo, se abrieron los contenedores y se realizaron mediciones del diámetro del crecimiento micelial de cada uno de los aislamientos. Para los cálculos del porcentaje de inhibición se tomó como base las mediciones del diámetro del crecimiento micelial de los aislamientos expuestos al biofumigante y el crecimiento del diámetro de la colonia testigo. Con estos datos, se calculó el porcentaje de inhibición micelial, mediante la fórmula de Abbott (4).

Porcentaje de inhibición =  $((dt - dc)/dt) \times 100$   
donde:

dt - diámetro del micelio del testigo

dc - diámetro del micelio expuesto al biofumigante

### Viabilidad postratamiento de los aislamientos

Luego de la exposición de los biofumigantes durante siete días, se transfirió el disco de micelio de cada uno de los aislamientos a un medio PDA fresco. Las placas se incubaron en la oscuridad a 27°C durante siete días. Se realizaron mediciones del diámetro del micelio para todos los aislamientos.

### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental Completamente Aleatorizado con tres réplicas por tratamiento. Se realizaron las pruebas Shapiro-Wilk y Levene para comprobar el ajuste a la distribución normal y la homogeneidad de varianza, respectivamente. Se realizaron comparaciones independientes del porcentaje de

inhibición de los siete aislamientos frente a cada especie de Brassicas, mediante un ANOVA de clasificación simple. Se empleó el Test de Tukey para la comparación de medias con 0,05 como nivel de significación. El procesamiento se realizó con el programa SPSS versión 22.0 (7).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de la inhibición del material biofumigante sobre los aislados fitopatógenos

La biofumigación con *B. juncea* a la concentración de 2,5 g/L no produjo efecto alguno en el crecimiento de las colonias de los aislamientos en estudio y no se observaron diferencias significativas entre los aislamientos evaluados. Con excepción de *R. solani*, el biofumigante de *B. oleracea* produjo un efecto de inhibición en el crecimiento micelial de los aislamientos. Los aislamientos que mostraron mayor porcentaje de inhibición correspondieron a *F. solani* (FP11 y M4), mientras que *F. oxysporum*, aislamiento FP10, fue el menos afectado frente al biofumigante de *B. oleracea*.

Los aislamientos 931 y O1 de *P. nicotianae* mostraron los mayores valores de inhibición frente a *S. alba* (2,5 g/L) y fue la única especie que provocó un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *R. solani*. (Fig. 1)

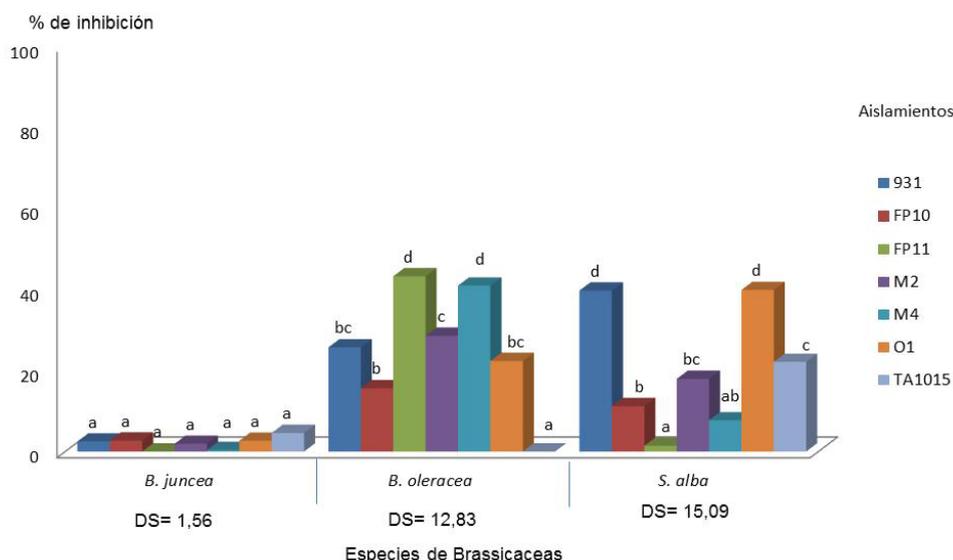
Cuando se incrementó la concentración de las especies de Brassicaceas a 5 g/L, aumentó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en todos los aislamientos (Fig. 2). El incremento de la concentración a 5 g/L de *B. juncea* aumentó la inhibición de forma considerable con respecto a la concentración evaluada a 2,5 g/L para todos los aislamientos. El aislamiento de *R. solani* demostró ser el menos sensible a la biofumigación de *B. juncea*.

El biofumigante de *B. oleracea* provocó el 100 % de inhibición en *P. nicotianae* (931 y O1), mientras que las demás especies de fitopatógenos resultaron inhibidas entre 35 a 50 %.

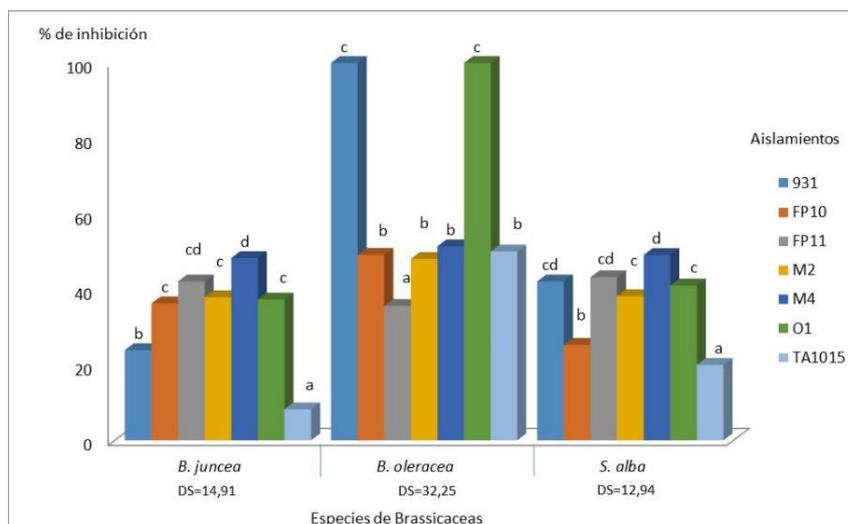
Los aislamientos de *P. nicotianae* (931y O1) expresaron solo un ligero incremento del porcentaje de inhibición frente al aumento de la concentración a 5 g/L de *S. alba*. Sin embargo, para los aislamientos de *F. solani* (FP-11 y M4) el incremento del porcentaje de inhibición superó a 40 %.

### Viabilidad postratamiento de los aislamientos

El diámetro de las colonias de los aislados expuestos durante siete días a los biofumigantes de las Brassicaceas (2,5 g/L) no afectó el crecimiento de los fitopatógenos, cuando el disco de agar fue transferido a un medio fresco de



**Figura 1.** Porcentaje de inhibición micelial de los aislamientos fitopatógenos frente a una solución 2,5 g/L de plantas brassicaceas / *Mycelial inhibition percentage of phytopathogen isolates against 2,5 g/L solution of brassicaceae plants.*



**Figura 2.** Porcentaje de inhibición micelial de los aislamientos fitopatógenos frente a una solución 5 g/L de plantas brassicáceas. / *Mycelial inhibition percentage of phytopathogen isolates against 5 g/L solution of brassicaceae plants.*

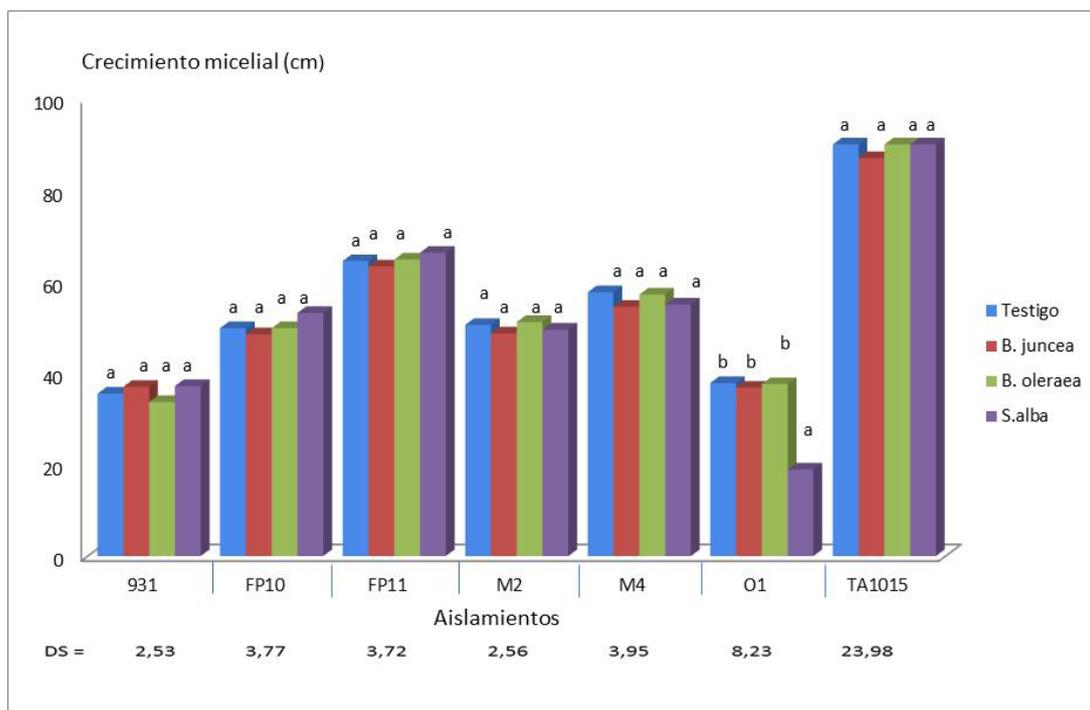
PDA. Excepto el aislamiento O1 de *P. nicotianae*, todos los aislamientos crecieron sin diferencia en el diámetro con la colonia de la cepa control (Fig. 3). Comportamiento diferente se obtuvo con los discos de micelio que fueron expuestos al material biofumigante de mayor concentración (5 g/L). Todos los aislamientos mostraron una disminución en el diámetro de la colonia con respecto a la cepa testigo. Para *R. solani* el crecimiento del micelio se afectó luego del tratamiento con el biofumigante de *B. juncea*, pero no existió diferencia significativa para el diámetro entre el testigo y el resto de los biofumigantes. Los aislamientos de *P. nicotianae* resultaron ser los más afectados, con una disminución del diámetro de la colonia en más de 20 % cuando fue comparado con el testigo (Fig. 4). Excepto para el aislamiento de *R. solani*, los resultados mostraron que *B. oleracea* y *S. alba* poseen potencialidades fungistáticas a concentraciones de 5 g/L.

Los resultados referidos al efecto fungistático de *B. oleracea* coinciden con los obtenidos por otros autores que observaron reducción del crecimiento de especies de *Fusarium* (8) y *Phytophthora* spp. (9). Dentro de las Brassicaceas, informan a *B. oleracea* como una de las especies con mayores potencialidades biofumigantes para el control de fitopatógenos (10).

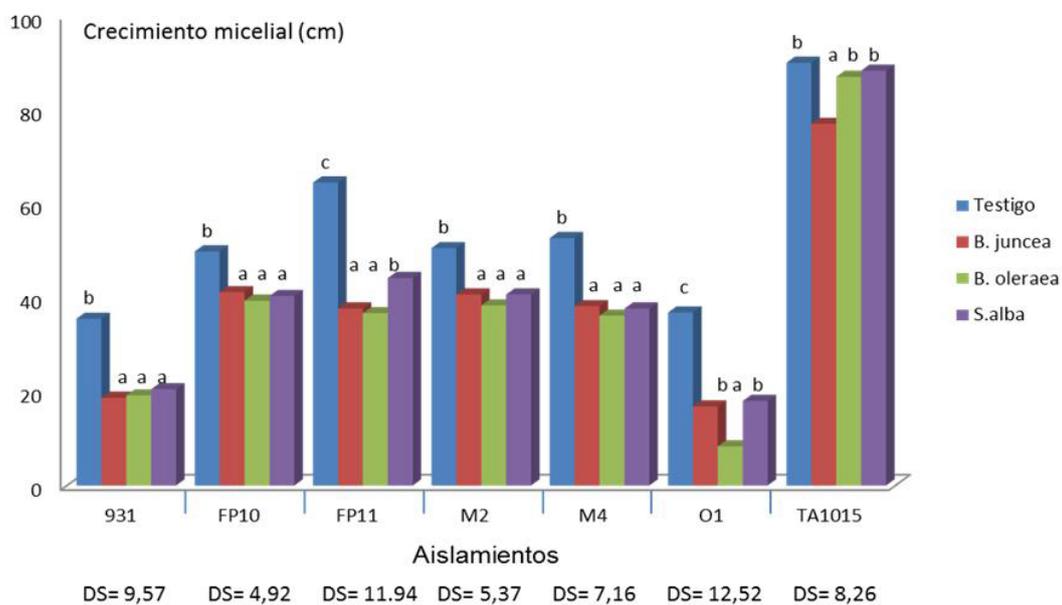
La variabilidad en la supresión de los aislamientos de especies fitopatógenas depende del tipo de biofumigante y, más específico, del tipo de compuesto y en la concentración que sea liberado por cada especie. Se informa que un limitado número de aislados de *Aphanomyces* y de *Phytophthora* son sensibles al pentil-etil ITC, que es uno de los isotiocianatos en las especies de Brassicaceas (11). Para *R. solani* se demostró el efecto de la biofumigación sobre la inhibición del crecimiento micelial y de los esclerocios (12). Los biofumigantes de las especies de *B. juncea*, *B. napus* y *Sinapis alba* demuestran resultados positivos en el manejo de *R. solani* en los suelos, mientras que, en otros ensayos con *B. juncea*, no resultaron satisfactorios (13).

Existen numerosos informes de la amplia posibilidad de las especies de la familia Brassicaceae por su efecto biofumigante sobre el control de nematodos (14), hongos fitopatógenos (15), insectos (16) y malezas (17).

La prohibición de fumigantes químicos, debido a su efecto nocivo a la capa de ozono y al medio ambiente, obliga a la búsqueda de otras alternativas más sostenibles y favorables para el hombre. La biofumigación abre nuevas investigaciones y posibilidades para el manejo de fitopatógenos de suelos en el cultivo del tabaco en Cuba.



**Figura 3.** Viabilidad postratamiento de los aislamientos después de estar expuestos a los compuestos biofumigantes de plantas brassicáceas (2,5 g/L). / *Post-treatment viability of isolates after exposure to brassicaceae plant biofumigants (2.5 g/L)*



**Figura 4.** Viabilidad postratamiento de los aislamientos después de estar expuesto a los compuestos biofumigantes de plantas brassicáceas (5 g/L). / *Post-treatment viability of isolates after exposure to brassicaceae plant biofumigants (5 g/L)*

## CONCLUSIONES

El incremento de la concentración de las especies biofumigantes de *B. juncea*, *B. oleracea* y *S. alba* a 5 g/L aumentó el porcentaje de inhibición del crecimiento *in vitro* de los aislamientos *P. nicotianae*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*.

Excepto para el aislamiento de *R. solani*, los resultados mostraron que *B. juncea*, *B. oleracea* y *S. alba* poseen potencialidades fungistáticas a concentraciones de 5 g/L.

## REFERENCIAS

1. Toledo V, Quintana F. Efectividad del Aceite Esencial de Melaleuca quinquenervia (cav.) para el manejo de enfermedades fúngicas en el cultivo del tabaco. Cuba Tabaco. 2015; 16 (1):18-26.
2. Fernández A, Muiño BL, Toledo V, Martínez ML. Estrategias de lucha para evitar epidemias provocadas por la enfermedad pata prieta del tabaco en Cuba. Fitosanidad. 2002; 6 (1): 35-42.
3. Toledo V, González A, Martínez J. Estabilidad de *Trichoderma harzianum* cepa A-53 en condiciones no controladas. Su influencia en la enfermedad pata prieta. Cuba Tabaco. 2016; 17 (2): 34-41.
4. Ríos P, Obregón S, Haro de A, Fernández P, Socorro M, Sánchez, M. Effect of Brassica biofumigant amendments on different stages of the life cycle of *Phytophthora cinnamomi*. Journal of Phytopathology. 2016; 164: 582-594.
5. Ganjewala D, Kumar S, Devi A, Ambika K. Advances in cyanogenic glycosides biosynthesis and analysis in plants: a review. Acta Biologica Szegediensis. 2010; 54: 1-14.
6. Dunne C, Dell B, Hardy GE. The effect of biofumigants on the vegetative growth of five *Phytophthora* species *in vitro*. Actas de Horticultura. 2003; 602: 45-51.
7. SPSS version 22., Brief guide. Disponible en línea en: [http://www.sussex.ac.uk/its/pdfs/SPSS\\_Brief\\_Guide\\_22.pdf](http://www.sussex.ac.uk/its/pdfs/SPSS_Brief_Guide_22.pdf) . Último acceso 20 de septiembre 2019.
8. Larkin R, Griffin P. Control of soil borne potato diseases using Brassica green manures. Crop Protection. 2007; 26 (7): 1067-1077.
9. Zurera C, Romero M, Porras C, Barrau R. Efecto biofumigante de especies de Brassica en el crecimiento de *Phytophthora* spp. *in vitro*. XI Congreso Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Albacete, España. Actas de Horticultura. 2007; 48:306-309.
10. Pereyra S, Avila A, Orecchia E. La biofumigación y el metam sodio como alternativas al uso de bromuro de metilo. Efecto sobre el control de malezas y las características químicas del suelo. Agri Scientia. 2008; 25 (2):75-79.
11. Smith BJ, Kirkegaard J. *In vitro* inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. Plant Pathology. 2002, 51: 585-593.
12. Apama KP, Girija VK. Effect of Biofumigation on mycelia growth and sclerotial germination of *Rhizoctonia solani* causing rot and web blight of cowpea. Int. J. Curs. Microbiology Ass. Sci. 2018; 7 (3): 2990-2999.
13. Maxwell H, Brown J, Zemetra R, Mazzola M. Effect of Brassicaceae seed meals with different glucosinolate profiles on *Rhizoctonia* root rot in wheat. Crop Protection. 2013; 48: 1- 5.
14. Youssef MMA. Biofumigation as a promising tool for managing plant parasitic nematodes. A review. Scientia Agriculturae, 2015; 10 (3): 115-118.
15. Iriarte LE, Sosa MC, Reybet GE. Efecto de la biofumigación con repollo sobre el control de *Fusarium oxysporum* en suelo. Revista de Investigaciones Agropecuarias. 2011; 37(3): 231-237.
16. Winde I, Wittstock U. Insect herbivore counter adaptations to the plant glucosinolate-myrosinase system. Phytochemistry. 2011; 72 (13): 1566-1575.
17. Perniola O, Chorzempa S, Staltari S, Molina MC. Biofumigación *in vitro* con Brassica juncea y Sinapis alba. Inhibición de la germinación y del crecimiento de plántulas de malezas. Revista Facultad de Agronomía. 2016; 115 (1): 91-98.

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses

**Contribución de los autores:** **Verónica Toledo:** Participó en la búsqueda de información, en el diseño de la investigación, en la recolección de los datos. Participó en el análisis de los resultados y redacción del borrador del artículo y la revisión crítica de su contenido y en la aprobación final. **Javier Martínez Pacheco:** Concibió la idea y planificó los tratamientos para la investigación, participó en las pruebas realizadas para evaluar los resultados. Participó en la búsqueda de información, en el diseño de la investigación, en la recolección de los datos. **Angélica de la C. González Toledo:** Colaboró en la investigación. Participó en los ensayos realizados para evaluar los resultados. Participó en la búsqueda de información. Participó en la redacción del artículo y la revisión de su contenido.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)