

Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *Lippia organoides* H.B.K. sobre el desarrollo micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk.

In vitro evaluation of the inhibitory activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K. on mycelial growth and sclerotial production of *Sclerotium cepivorum* Berk.

Daniel I. Ospina¹, Vanessa Álvarez¹, Harlen G. Torres², Manuel S. Sánchez¹, y Carmen R. Bonilla^{3*}

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 237, Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

²Facultad de Ingeniería y Administración, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

³Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Cundinamarca, Colombia.

*Autor para correspondencia: crbonillac@unal.edu.co

Rec.: 30.03.11 Acept.: 21.12.11

Resumen

Se evaluó la capacidad in vitro de aceites esenciales obtenidos de hojas y flores de diferentes muestras de *Lippia organoides* cultivada en condiciones del Valle del Cauca, Colombia, para inhibir el crecimiento micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, patógeno causante de la pudrición blanca en cebolla. Todos los aceites evaluados mostraron efecto inhibitorio tanto en el crecimiento micelial como en la formación de esclerocios, en concentraciones de 250 - 1350 µL/L. No obstante, aquellos obtenidos a partir del quimiotipo I presentaron el mayor poder inhibitorio en el crecimiento del micelio (concentración mínima inhibitoria, CMI = 120 µL/L) y en la formación de esclerocios. Así, el quimiotipo I de *L. organoides* puede ser utilizado potencialmente para el control de la pudrición blanca en cebolla.

Palabras clave: Aceites esenciales, actividad antifúngica, cebolla, *Lippia organoides*, *Sclerotium cepivorum*.

Abstract

Essential oils obtained from leaves and flowers of different samples of *Lippia organoides* cultivated under the environmental conditions of the Cauca Valley, Colombia, were tested in vitro against mycelial growth and sclerotial formation in *Sclerotium cepivorum*, the pathogen responsible for onion white rot. All the evaluated oils in concentrations ranging from 250 to 1350 µL/L exhibited inhibitory activity against both the mycelium and sclerotia of the pathogen. However, those corresponding to the chemotype I (minimum inhibitory concentration, MIC = 120 µL/L) reached the strongest inhibition results regarding the evaluated pathogen structures. Hence, the chemotype I of *L. organoides* can be said to have potential inhibitory activity against onion white rot.

Key words: Antifungal activity, essential oils, *Lippia organoides*, onion, *Sclerotium cepivorum*.

Introducción

La generación de productos de origen biológico como alternativas para el control de plagas y enfermedades hace parte de las prácticas de innovación para una agricultura sostenible y competitiva, además de ser una de las estrategias para lograr mayor competitividad en la producción y el mercadeo agrícola nacional. La investigación, el desarrollo, el diseño y la formulación de productos fungistáticos de origen biológico son estrategias que impactan positivamente el medio ambiente y la salud tanto de los operarios agrícolas como del consumidor final. Adicionalmente, estos productos favorecen el mercadeo de las hortalizas y frutas en mercados internacionales con estrictas normatividades sobre trazas de agroquímicos.

Los compuestos biológicamente activos obtenidos a partir de fuentes naturales son de interés para los investigadores que trabajan en el control de enfermedades infecciosas tanto para el hombre como para las plantas (Clark y Hufford, 1993). En los últimos años el interés por la evaluación de extractos de plantas con actividad antimicrobiana se ha incrementado, especialmente aquéllas que presentan potencial actividad contra fitopatógenos de cultivos de hortalizas, entre ellas *Sclerotium cepivorum* Berk., agente causal de la pudrición blanca del tallo en cultivos de cebolla de bulbo o 'cabezona' (Pinto *et ál.*, 1998; Smolinska y Horbowicz, 1999). En Colombia se ha registrado esta enfermedad en zonas productoras de clima frío de los departamentos de Nariño y Boyacá y en Tenerife (Valle del Cauca). Según las evaluaciones del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (MADR) para el 2003 el área cultivada con cebolla de bulbo era de 11.020 ha; la producción de 231.632 t y la productividad parcial nacional de la tierra de 21.69 t/ha, superior al promedio mundial (17.45 t/ha). La producción se concentra en nueve departamentos entre los cuales se destaca Boyacá como el mayor productor y el que registra los mejores rendimientos por hectárea (Melo *et ál.*, 2006).

El género *Lippia* (Verbenaceae) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas y arbustos. Las especies están especialmente

distribuidas en países de América Central (México, Guatemala, Cuba) y América del Sur (Venezuela, Brasil, Colombia). Muchas de ellas son tradicionalmente utilizadas en infusión para controlar afecciones gastrointestinales y respiratorias; además, las hojas de la mayoría de estas especies son utilizadas como condimentos en la preparación de alimentos (Pascual *et ál.*, 2001). En Suramérica es empleada contra resfriados, gripe, bronquitis, tos y asma. *Lippia origanoides* H.B.K., por su parte, es utilizada como condimento en la preparación de alimentos, como infusión para el tratamiento de diarreas, analgésico, antiinflamatorio y antipirético (Morton, 1981) y por sus propiedades antioxidantes, antisépticas, calmantes, cicatrizantes, desinflamantes, digestivas, estomáquicas y estimulantes (Terblanché y Kornelius, 1996).

Dado que los aceites esenciales (AE) obtenidos a partir de *L. origanoides* tienen propiedades como agentes con actividad antimicrobiana (Dos Santos *et ál.*, 2004), el objetivo del presente trabajo fue evaluar in vitro su efecto sobre la inhibición del crecimiento micelial y la formación de esclerocios del hongo *S. cepivorum* en el cultivo de cebolla de bulbo, un producto importante de la agricultura colombiana.

Materiales y métodos

Las muestras utilizadas en el estudio fueron tomadas de plantas adultas de *L. origanoides* cultivadas en el Centro Experimental de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira (CEUNP), donde se encuentra la Colección de Trabajo de Plantas Medicinales Nativas. Las accesiones originales provienen de una recolección realizada en 2003 en la localidad Jordán Sube (cuenca del cañón del río Chicamocha, Santander, Colombia).

La extracción de los aceites esenciales (AE) se hizo a partir de muestras de 200 g de material fresco (hojas y flores) que se sometieron durante 3 h a destilación por arrastre con vapor. Después de la extracción, se empleó sulfato de sodio anhidro para remover el agua. Los aceites esenciales fueron almacenados en viales oscuros y refrigerados hasta su uso en los ensayos de actividad antifúngica (Gutiérrez *et ál.*, 2009). Las concentraciones

fueron expresadas como volumen de AE/volumen de la caja de Petri.

Determinación de la actividad antifúngica

Las muestras de *S. cepivorum* fueron recolectadas en la finca Rancho Alegre del corregimiento de Tenerife, Palmira, Valle del Cauca, a partir de material vegetal de cebolla infestado (bulbos, hojas, raíces) y suelo. Los esclerocios aislados se desinfectaron con hipoclorito de sodio-1% y etanol-70%, luego fueron sumergidos durante 1 min en agua destilada estéril y posteriormente fueron sembrados en cajas de Petri con PDA, realizando sucesivas siembras a partir del micelio formado para obtener cultivos puros, los cuales se utilizaron para la evaluación antifúngica de los AE (Jones *et ál.*, 2004).

La actividad antifúngica se determinó con base en la evaluación del crecimiento del micelio mediante el método de dilución en agar (Sahin *et ál.*, 2004). En el centro de cada caja de Petri se sembró un disco de micelio de 5 mm de diámetro, con 20 mL de PDA (papa-dextrosa-agar). Se agregaron por lo menos cinco concentraciones de AE disueltos en Tween-20, las cuales variaron entre 1350 µL/L y 15 µL/L. Se agregó un tratamiento testigo (sin control) Las cajas fueron selladas e incubadas a 20 °C durante cuatro días. Diariamente se midió el diámetro del micelio de los tratamientos con AE y los testigos, hasta que el micelio alcanzó las paredes de la caja de Petri en el tratamiento control. El conteo de esclerocios se realizó al final de tres semanas de incubación del hongo. El porcentaje de inhibición para micelios

y esclerocios fue calculado de acuerdo con la ecuación propuesta por Manici *et ál.* (1997):

$$\text{Inhibición (\%)} = [1 - (\text{Diámetro micelio tratado} / \text{Diámetro micelio control})] \times 100$$

$$\text{Inhibición (\%)} = [1 - (\text{Número esclerocios tratamiento} / \text{Número esclerocios control})] \times 100$$

Los AE hasta la concentración de 650 µL/L inhibieron totalmente el crecimiento micelial. A partir de esta concentración se evaluaron otras menores hasta encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI) en la cual ya no se observó crecimiento micelial significativo. Los tratamientos fueron aplicados en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Los datos obtenidos se procesaron con el software Statistical Analysis System (SAS, 1990) utilizando la prueba del rango múltiple de Duncan para establecer comparaciones entre tratamientos.

Resultados y discusión

Todos los AE evaluados mostraron capacidad para inhibir el crecimiento micelial de *S. cepivorum* dentro de un rango de concentraciones entre 250 y 1350 µL/L, con excepción de los aceites de la muestra III y el de hojas de la muestra II (Cuadro 1, Foto 1). Los AE tanto de hojas como de flores de la muestra I revelaron la mayor actividad inhibitoria, con una CMI de 120 µL/L. La reducción en la concentración de AE en todos los tratamientos resultó en un menor efecto inhibitorio.

El proceso de formación de esclerocios, estructuras de reproducción asexual propias

Cuadro 1. Porcentajes de inhibición in vitro del crecimiento micelial por aceites esenciales (AE) de *Lippia organoides* en diferentes concentraciones.

Muestra		Concentraciones de AE (µL/L)				
		1350	650	250	120	60
		Inhibición (%)				
I	Hojas	100	100	100	100	69 c
	Flores	100	100	100	100	73 cb
II	Hojas	100	77 b*	—	—	—
	Flores	100	100 a	—	—	—
III	Hojas	94	72	—	—	—
	Flores	93	73	—	—	—

* Valores con letras iguales en cada muestra y columna no difieren significativamente (P < 0.05), según la prueba de Duncan.

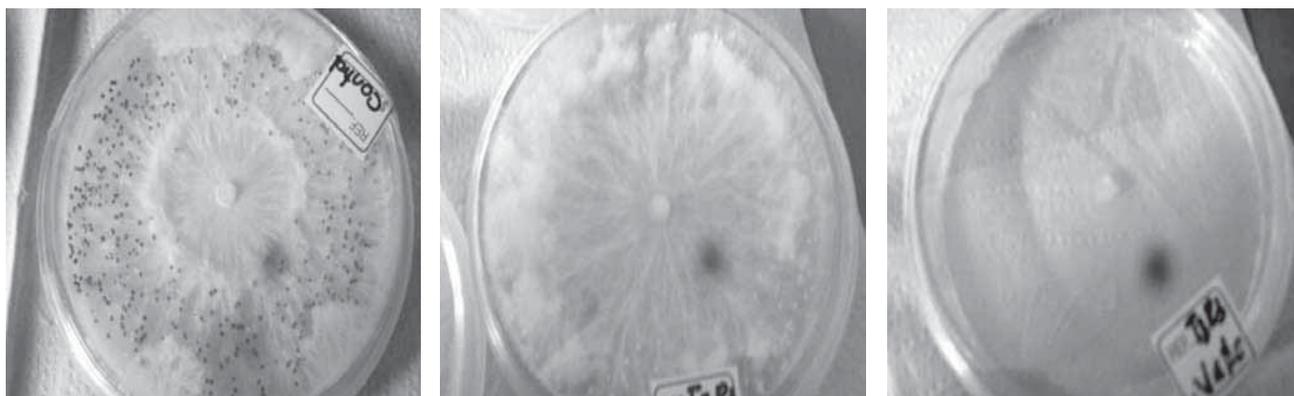


Foto 1. De izquierda a derecha, respectivamente: Formación de micelio del control, efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides* en el crecimiento del micelio, y en el desarrollo micelial.

de *S. cepivorum* que pueden permanecer latentes en el suelo hasta por 20 años, fue completamente inhibido por la actividad de los AE de la muestra I y de las flores de la muestra II. Los AE de hojas y flores de la muestra III y de flores de la muestra II permitieron el desarrollo micelial hasta la formación de esclerocios, lo que se reflejó en su menor porcentaje de inhibición (Cuadro 2).

La composición química de los AE analizada mediante cromatografía de gases

acoplada a espectrometría de masas, mostró un perfil químico diferente para cada una de las muestras evaluadas (Cuadro 3), lo que coincide con los resultados preliminares obtenidos por Potes (2007). En las hojas y flores de la muestra I, el timol —un compuesto de comprobada acción antifúngica (Braga *et al.*, 2007)— fue el componente principal al revelar una proporción muy superior en relación con las otras dos muestras, lo cual explica, en parte, su alta actividad inhibitoria, tanto para

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición in vitro de la formación de esclerocios por aplicación de aceites esenciales de *Lippia origanoides*.

Muestra		Rango de concentraciones de AE ($\mu\text{L/L}$)			
		1350	650	250	120
		Inhibición (%)			
I	Hojas	100	100	100	100
	Flores	100	100	100	100
II	Hojas	100	76 c	—	—
	Flores	100	100 a	—	—
III	Hojas	66 c*	16 d	—	—
	Flores	100 a	91 b	—	—

* Valores con letras iguales en cada muestra y columna no difieren significativamente ($P < 0.05$), según la prueba de Duncan.

Cuadro 3. Componentes principales de quimiotipos en aceites esenciales de *Lippia origanoides*.

Muestra		Componentes principales	Cantidad relativa (%)
I	Hojas	timol; γ -terpineno; <i>p</i> -cimeno	45, 13.5, 10
	Flores	timol; γ -terpineno; <i>p</i> -cimeno	33.1, 13.8, 8.7
II	Hojas	<i>trans</i> - β -cariofileno; α - humeleno; (β + α)-eudesmol	16.7, 13.2, 8.3
	Flores	<i>trans</i> - β -cariofileno; α - humeleno; (β + α)-eudesmol	17.4, 13, 6.2
III	Hojas	<i>trans</i> -cariofileno; β -mirceno; α - humeleno	16.5, 14.2, 9.7
	Flores	<i>trans</i> -cariofileno; β -mirceno; α - humeleno	16, 11.2, 10.6

crecimiento micelial como para formación de esclerocios.

Un estudio de la actividad de monoterpenos sobre el desarrollo micelial (Lucini *et al.*, 2006) muestra que el borneol, el alcanfor, 1,8-cineol (eucaliptol), el geraniol, el linalol, el mentol y el timol presentan una MIC de 400, 1200, 1200, 400, 700, 500 y 400 $\mu\text{L/L}$, respectivamente. Estos resultados demuestran la actividad inhibitoria de los AE evaluados en este trabajo y sugieren que dicha actividad no se debe a un solo componente sino a un efecto sinérgico de los componentes de los AE.

Conclusiones

- El timol, γ -terpineno y *p*-cimeno fueron identificados como componentes principales de los aceites esenciales de muestras (quimiotipos) de *L. organoides*.
- Las muestras evaluadas de aceites esenciales de *L. organoides* presentan uso potencial como controladoras de la pudrición blanca en cebolla causada por *S. cepivorum*.
- El crecimiento micelial y la formación de esclerocios *S. cepivorum* fueron afectados por la aplicación de aceites esenciales de *L. organoides*.
- La mayor actividad inhibitoria se presentó en los aceites esenciales con mayor porcentaje de timol (hojas y flores de la muestra I).

Agradecimientos

Al grupo de investigación en Recursos Genéticos de Plantas Medicinales Aromáticas y Condimentarias; Evaluación, Colección, Producción y Poscosecha y a la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

Referencias

- Braga, P. C.; Alfieri, M.; Culici, M.; y Dal Sasso, M. 2007. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses* 50(6):502 - 506.
- Clark, A. M.; y Hufford, C. D. 1993. Discovery and development of novel prototype antibiotics for opportunistic infections related to the acquired immunodeficiency syndrome. En: Human medical agents from plants. American Chemical Society. Symposium series 534. Washington, D. C. p. 228 - 241.
- Dos Santos, F. J.; Lopes, A. D.; Cito, G. L.; De Oliveira, E. H.; De Lima, S. G.; y Reis, F. 2004. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K. *J. Essent. Oil Res.* 16:504 - 506.
- Gutiérrez, M. M.; Stefanazzi, N.; Werdin-González, J.; Benzi, V.; y Ferrero, A. A. 2009. Actividad fumigante de aceites esenciales de *Schinus molle* (Anacardiaceae) y *Tagetes terniflora* (Asteraceae) sobre adultos de *Pediculus humanus capitis* (Insecta, Anoplura, Pediculidae). *Bol. Latin. Caribe Plantas Med. Arom.* 8 (3):176 - 179.
- Jones, E. E.; Mead, A.; y Whipps, J. M. 2004. Effect of inoculum type and timing of application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*: control of sclerotinia disease in glasshouse lettuce. *Plant Pathol.* 53 (5):611 - 620.
- Lucini, E. I.; Zunino, M. P.; López, M. L.; y Zygadlo, J. A. 2006. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *J. Phytop.* 154:441 - 446.
- Manici, L. M.; Lazzeri, L.; y Palmieri, S. 1997. In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.* 45(7):2768 - 2773.
- Melo, L. I.; Melo, M. M.; y Rodríguez, L. F. 2006. Competitividad del sistema agroalimentario de la cebolla de bulbo con enfoque de cadena productiva en el distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá). *Agron. Col.* 24(2):367 - 377.
- Morton, A. 1981. Atlas of medicinal plants of middle america: Bahamas to Yucatan. Charles C. Thomas Publisher Ltd., Springfield, Illinois. p. 745 - 750.
- Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez, M. D.; y Villar, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnophar.* 76:201 - 214.
- Pinto, C. M. F.; Maffia, L. A.; Casali, V. W. D.; y Cardoso, A. A. 1998. In vitro effect of plant leaf extracts on micelyal growth and sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*. *J. Phytopath.* 146:421 - 425.
- Potes, S. J. A. 2007. Extracción, caracterización y evaluación del potencial agroindustrial del aceite esencial de dos quimiotipos de *Lippia organoides* en condiciones del Valle del Cauca. Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 69 p.
- Sahin, F.; Güllüce, M.; Daferera, D.; Sökmen, A.; Sökmen, M.; Polissiou, M.; Agar, G.; Özer, H. 2004. Biological activities of the essential oils

- and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* 15(7): 549-557.
- SAS/STAT. 1990. SAS/STAT. User guide. Versión 6. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- Smolinska, U. y Horbowicz, M. 1999. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. *J. Phytopath.* 147:119 - 124.
- Terblanché, F. C. y Kornelius, G. 1996. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae).-A literature review. *JEOR.* 8:471 - 485.