

# Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de *Colletotrichum* spp

## In vitro evaluation of inhibitory activity of plant extracts on *Colletotrichum* spp

Alexander Pérez Cordero<sup>1\*</sup>, Johanna Rojas Sierra<sup>2</sup>, Leonardo Chamorro Anaya<sup>3</sup>, y Katy Pérez Palencia<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Grupo Bioprospección Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre, Colombia. <sup>2</sup>Grupo Bioprospección Agropecuaria, Facultad de Educación y Ciencias, Universidad de Sucre, Colombia. <sup>3</sup>Biólogos, Campo universitario AA 406, Universidad de Sucre. Sincelejo, Sucre, Colombia. \*Autor para correspondencia: alexander.perez@unisucra.edu.co

Rec.: 08.06.11 Acep.: 22.09.11

### Resumen

Se evaluó la actividad inhibitoria in vitro de extractos de hojas de *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Jatropha gossypifolia*, *Eucalyptus* sp., *Melia azederach* y *Mascagnia concinna* sobre aislados de hongo del género *Colletotrichum*, causante de la enfermedad antracnosis en el cultivo del ñame (*Dioscorea alata*, *D. rotundata*) en el departamento de Sucre, Colombia. Para la obtención de extractos etanólicos de hojas de *M. officinalis* y *O. vulgare*, se utilizó el método de percolación y para las otras especies vegetales, el método de Soxhlet. Una vez preparados los extractos de hojas, se evaluó su actividad inhibitoria sobre seis aislados de hongo del género *Colletotrichum* (BVC 279a, BVC 279b, BVC 853, BVC 040, BVC 342 y BVC 507). Para la prueba inhibitoria se utilizó el método de siembra directa sobre la superficie del medio papa-dextrosa-agar. Sobre las diferentes cepas se adicionaron 250 µl de cada extracto por separado. Se utilizó un control positivo con nistatina (4 mg/ml) y un testigo absoluto sin ningún tipo de tratamiento. La prueba se evaluó midiendo el crecimiento radial de cada cepa con los diferentes tratamientos a 96 y 168 h. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con tres repeticiones, para probar diferencias significativas entre tratamientos, cepas (aislados) y tiempo de inhibición. Los resultados expresados en porcentaje de inhibición, mostraron una alta actividad de los extractos obtenidos de las hojas de las plantas de *M. azederach* y *M. concinna*, sobre los hongos evaluados y su acción fue similar al control positivo.

**Palabras clave:** Antracnosis, *Colletotrichum*, control de enfermedades, extractos vegetales.

### Abstract

The objective of this study was to evaluate in vitro inhibitory activity of extracts from leaves of *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Jatropha gossypifolia*, *Eucalyptus* sp. *Melia azederach* and *Mascagnia concinna* on isolated fungus of the genus *Colletotrichum*, which causes anthracnose disease in the crop of yam (*Dioscorea alata*, *D. rotundata*) in the department of Sucre, Colombia. To obtain the ethanol extract from leaves of *M. officinalis* and *O. vulgare* methods of percolation were used and for the rest of plant species, the Soxhlet method was performed. Once leaf extracts were prepared, evaluation for inhibitory activity on six isolated fungus of the genus *Colletotrichum* (BVC 279a, BVC 279b, BVC 853, BVC 040, BVC 342 and BVC 507) was carried out. Inhibitory to the test method was used for direct seeding on the surface of potato-dextrose agar. On the different strains were added 250 µl of each extract separately. We used a positive control with nystatin (4 mg/ml) and an absolute control without any treatment. The test was evaluated by measuring the radial growth of each strain with different

treatments at 96 and 168 h. A randomized complete block with three replications, to test significant differences between treatments, strains and inhibit time was used. The results expressed as percentage of inhibition, showed high activity of extracts obtained from leaves of plants of *M. azederach* and *M. concinna*, the fungi evaluated and its action was similar to the positive control.

**Key words:** Anthracnose, *Colletotrichum*, pest control, plant extracts.

## Introducción

Los países situados en la zona tropical tienen un ambiente óptimo para el cultivo de varios productos agrícolas. Uno de los productos de importancia socioeconómica y cultural para la costa Caribe colombiana es el ñame (*Dioscorea alata*, *D. rotundata*) el cual tiene su mayor producción en los departamentos de Córdoba, Bolívar y Sucre, constituye cerca del 92% de la producción nacional y beneficia, aproximadamente, 18.500 familias de pequeños productores. La producción en esta región depende principalmente de las especies *Dioscorea alata* y *D. rotundata*, de las cuales la primera especie es altamente susceptible a hongos patógenos del género *Colletotrichum*. Estos hongos causan al cultivo antracnosis, una enfermedad conocida por los productores como 'la quemazón del ñame'. Con el término antracnosis se acostumbra designar las enfermedades cuya característica es presentar lesiones típicas necróticas (tejidos muertos) en los tallos, hojas y frutos de las plantas afectadas. *Colletotrichum* afecta numerosos cultivos y registra en Colombia un alto índice de daños agroeconómicos en todas las áreas productoras. Los informes estadísticos muestran pérdidas hasta de 100% que dependen de las condiciones de susceptibilidad de los clones, lo cual conlleva un incremento en los costos de producción para los productores (Mendoza *et al.*, 2007).

La antracnosis del ñame fue considerada inicialmente como una patología sin importancia económica, que a través del tiempo se ha ido extendiendo a las diferentes regiones de producción en Sucre, Bolívar y Córdoba. Sin embargo, en la actualidad es la enfermedad fúngica de mayor relevancia económica, por las pérdidas que ocasiona en este cultivo. Su severidad conlleva el uso excesivo de fungicidas, lo que resulta una práctica costosa,

poco eficaz y nociva para el ambiente (Pérez *et al.*, 2003).

Los intentos para dar solución al problema de antracnosis han tenido diferentes alternativas. Las plantas nativas siguen siendo en la actualidad una alternativa valiosa para el tratamiento de diversas enfermedades en cultivos a nivel mundial. Es importante la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos que ayuden a controlar el creciente incremento de cepas patógenas de *Colletotrichum* de elevada resistencia a los fungicidas. La comunidad científica mundial evalúa cada día diferentes extractos, en su mayoría de origen vegetal, con la expectativa de que su acción sea más eficiente, su espectro de actividad más amplio, produzcan menos efectos adversos y a la vez no induzcan el surgimiento de cepas resistentes (Bernal *et al.*, 2005).

En la actualidad el uso de agrotóxicos sigue siendo el método más común para controlar las plagas y enfermedades. Sin embargo, la utilización masiva e indiscriminada de estos productos ha incrementado la población de patógenos resistentes en los cultivos, ocasionando un aumento significativo en los costos de producción y problemas de contaminación ambiental. Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos que representen alternativas en la protección de los cultivos contra la acción de fitopatógenos, cuya actividad, selectividad, seguridad ambiental y alimentaria sea más eficiente. En este sentido, los productos naturales derivados de las plantas son una fuente de compuestos biológicos potenciales para el control de fitopatógenos, no solo por su diversidad en estructuras químicas, sino por su acción biológica específica y su carácter inocuo sobre el ambiente (Bernal *et al.*, 2005).

El departamento de Sucre (Colombia) cuenta con gran diversidad de especies vegetales en diferentes nichos ecológicos, de las cuales se desconoce su potencial farmacoló-

gico. Muchas de ellas son nativas y aún existe escasa información sobre su posible potencial biológico en la inhibición de microorganismos patógenos de plantas, en especial sobre el hongo que causa la enfermedad de la antracnosis. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de *Colletotrichum*, causante de la antracnosis en ñame en el departamento de Sucre, y de esta manera contribuir al incremento de su producción en la costa Caribe y disminuir el deterioro del ambiente por el uso indiscriminado de pesticidas.

## Materiales y métodos

### Recolección del material vegetal

La recolección del material se realizó en diferentes zonas del departamento de Sucre. Las especies utilizadas fueron: *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Jatropha gossypilia*, *Eucalyptus* sp., *Melia azederach* y *Mascagnia concinna*. La extracción de los metabolitos se hizo en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad de Sucre.

### Proceso de extracción

Para la obtención de extractos vegetales fueron utilizados los métodos de percolación (Díaz y Ramírez, 2007), modificado en el Laboratorio de Fitoquímica y Microbiología de la Universidad de Sucre, y el método de Soxhlet (Gualtier *et al.*, 2008).

Para la obtención de los extractos vegetales por el método de percolación se pesaron 270 g de hojas fresca de *O. vulgare* y 74 g de *M. officinalis*, las cuales fueron picadas y depositadas en frasco de 1.000 ml con adición de etanol a 97% en temperatura ambiente, cubre la totalidad del material y hace pasar el solvente repetidas veces sobre él, antes de una filtración, durante ocho días. El extracto etanólico obtenido fue concentrado y secado en el rota-evaporador de presión reducida. Para los extractos de *M. azederach*, *J. gossypilia*, *Eucalyptus* sp., y *M. concinna* se utilizó el método Soxhlet, el cual consistió en tomar hojas picadas con un peso de 260 g de *Eucalyptus* sp., 200 g de *J. gossypilia* y 240 g para las dos plantas restantes, seguido de

sumersión en 1000 ml de etanol a 97% en el equipo soxhlet durante 8 h, para finalmente concentrarlo a una presión reducida en un rota-evaporador, antes de la obtención de cada extracto.

### Evaluación de la actividad antifúngica

La actividad inhibitoria de los extractos fue evaluada en seis aislados de hongos *Colletotrichum*, que se encuentran en la colección del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre y referenciadas como: BVC 279a, BVC 279b, BVC 853, BVC 040, BVC 342 y BVC507. Para la prueba de actividad inhibitoria se utilizó el método de siembra directa con crecimiento. Para la siembra se tomó un área de crecimiento 5 mm x 5 mm de cada aislado que se encontraba en el mismo tiempo de crecimiento (7 días), el cual se inoculó sobre la superficie del medio papa-dextrosa-agar (PDA), en ambiente aséptico. Una vez realizada la siembra de los diferentes aislados, se procedió a efectuar la prueba de inhibición, adicionándole 250 µl de cada extracto sobre la superficie de crecimiento de cada aislado y su posterior incubación a 30 °C. En las evaluaciones se incluyó un control positivo con nistatina (4 mg/ml) y un testigo absoluto sin tratamiento. La prueba se hizo por triplicado y se midió el crecimiento radial a las 96 y 168 horas. El resultado se interpretó como porcentaje de índice de inhibición ( $\text{Índice antifúngico (\%)} = (1 - D_a / D_b) \times 100$ ), el cual se determinó midiendo el crecimiento en cada tratamiento ( $D_a$ ), dividiéndolo sobre el crecimiento del testigo absoluto ( $D_b$ ). Este resultado se le resta a la unidad y se multiplica por 100 (Guo *et al.*, 2008).

### Análisis estadístico

Se hizo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. Para probar diferencias significativas entre tratamientos, cepas y tiempo de inhibición, se plantearon las siguientes hipótesis nulas y alternativas:  $H_0$  = No existen diferencias entre efectos de actividad inhibitoria de los extractos vegetales, las cepas de hongos evaluados, ni entre tiempos de inhibición de los extractos sobre los hongos;  $H_a$ : Sí existen diferencias entre los efectos debidos a las variables anterior-

res. Para probar las anteriores hipótesis se realizaron los correspondientes análisis de varianza (Anova) para lo cual se utilizó el programa R versión 2.11 (R Development Core Team, 2009).

### Resultados y discusión

Este estudio hizo parte de un trabajo preliminar que buscaba estandarizar un método de extracción y la cantidad mínima de materia prima requerida para obtener mayor rendimiento en eficiencia y actividad antifúngica. Trabajos recientes con el método de extracción por Soxhlet utilizando 500 g de hojas secas de *M. azederach* y *M. concinna*, demostraron resultados óptimos en la cantidad del extracto obtenido y mayor actividad antifúngica sobre aislados de hongos del género *Colletotrichum* (Chamorro y Pérez, 2011).

Las características macroscópicas observadas en medio PDA y microscópicas (40x) de los aislados del género de *Colletotrichum* evaluados se observan en la Foto 1. En el Cuadro 1, se muestran los resultados de la actividad antifúngica de los diferentes extractos evaluados. Los análisis estadísticos indican diferencias significativas entre tratamientos

( $P < 0.01$ ), observándose mayores actividades en los tratamientos T5 y T6 sobre los seis aislados, con respecto a los tratamientos T1, T2, T3 y T4, los cuales aunque presentaron índice de inhibición éste no se dio en todos los aislados. Así mismo los tratamientos T5 y T6 presentaron actividad inhibitoria igual al control positivo (T7). La eficiencia de los tratamientos T5 y T6 fue de 100% desde el primer tiempo de evaluación (96 h) y su acción se conservó igual en los dos tiempos evaluados. Con el tratamiento T1 se observó un ligero aumento de la inhibición entre tiempos de evaluación, mientras que el tratamiento T2 no mostró cambios en su actividad.

En la Foto 2 se muestra el efecto de inhibición de los extractos de *M. azederach* (Foto 2A) y *M. concinna* (Foto 2B) sobre uno de los aislados y en la Foto 2C se observa el efecto de *J. gossypilia* con relación al testigo absoluto (Foto 2D).

Se observaron diferencias ( $P < 0.01$ ) entre el índice de inhibición de los extractos sobre los hongos evaluados. El aislado C40 presentó la mayor susceptibilidad a los extractos vegetales, con un índice de inhibición de 70%, por el contrario el aislado C853 fue la menos

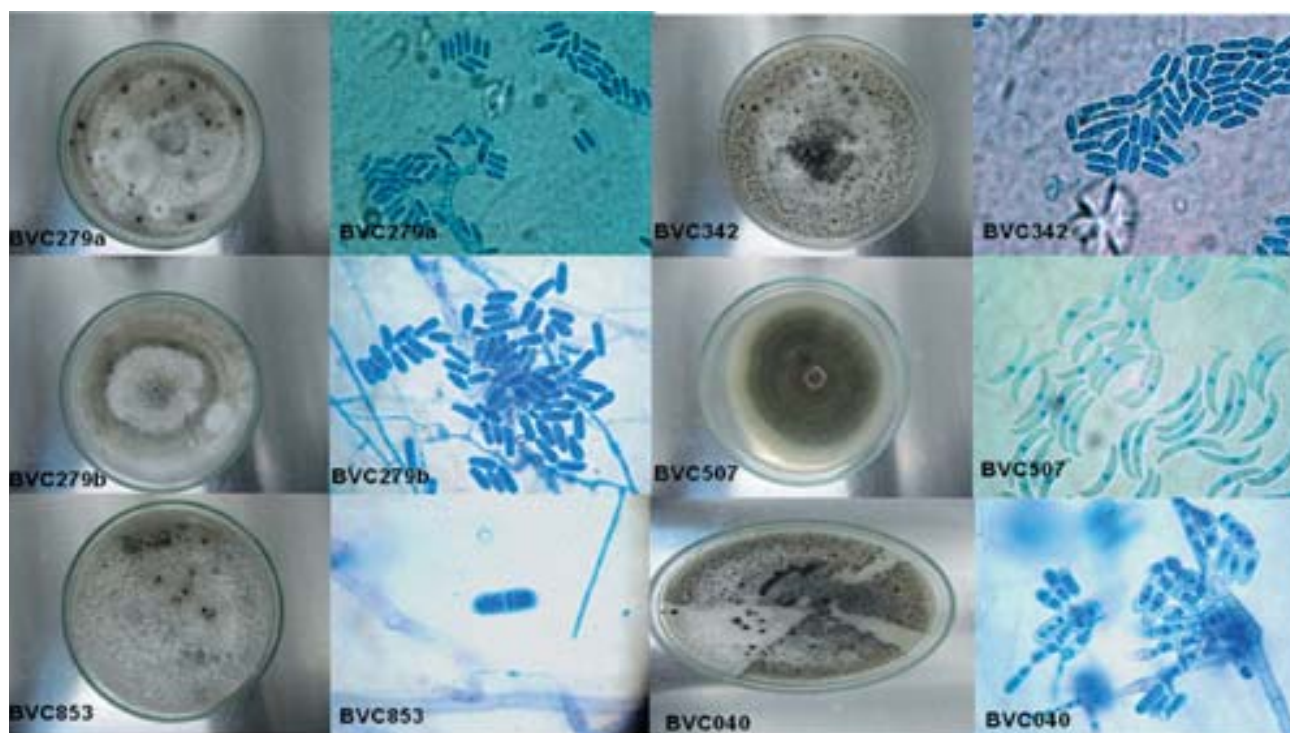
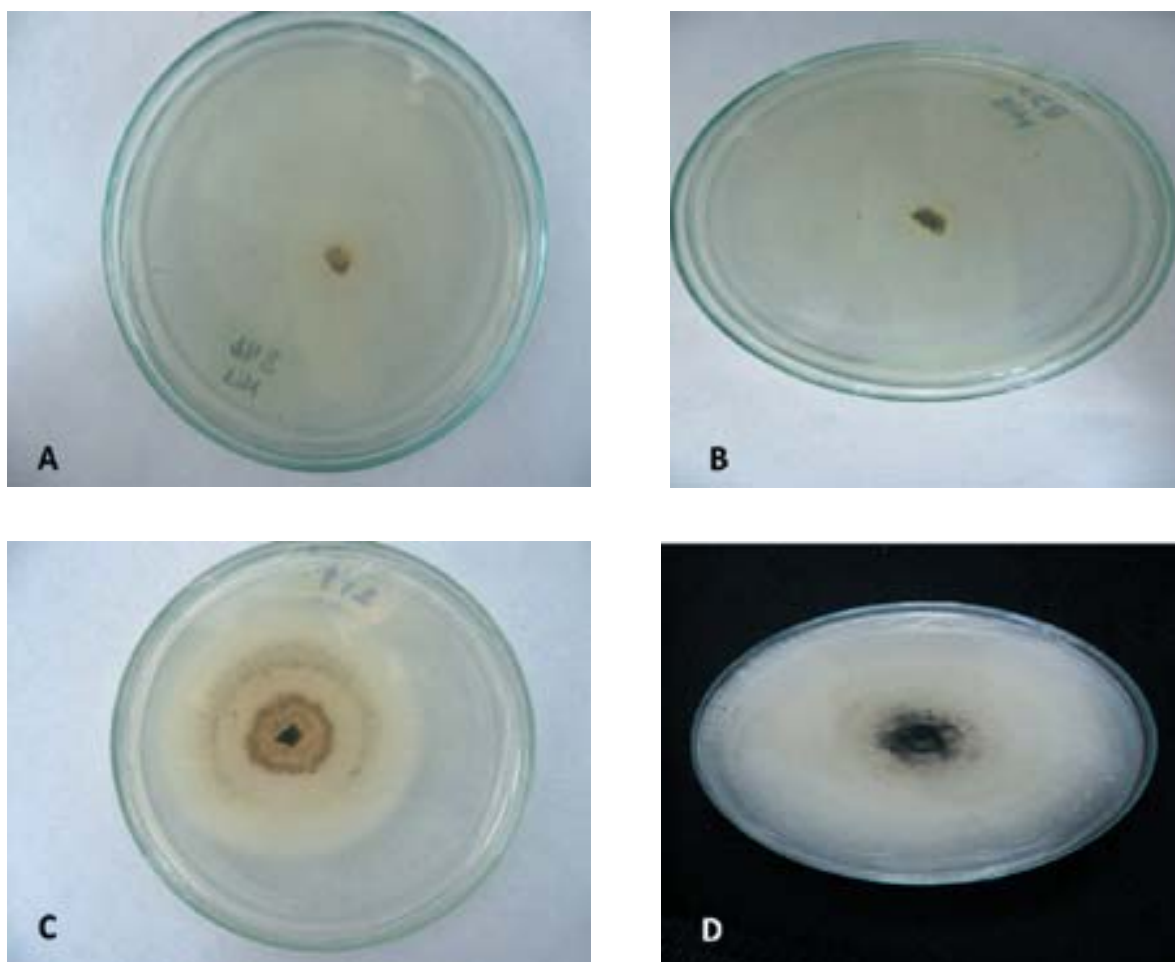


Foto 1. Características micro y macroscópicas de cepas de *Colletotrichum*. BVC: Biotecnología Vegetal *Colletotrichum*.

**Cuadro 1.** Índice de inhibición de los extractos vegetales sobre diferentes cepas de *Colletotrichum*, en diferentes tiempos después de aplicados los tratamientos.

Cepas	Tiempo (horas)	Tratamientos (extracto de plantas)						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
C279a	0	0	0	0	0	0	0	0
	96	40	67.5	25	0	100	100	100
		48.94	74.47	38.3	0	100	100	100
		60.47	72.09	48.8	0	100	100	100
	168	50	75	91.7	0	100	100	100
		54.84	79.03	93.5	0	100	100	100
52.63		73.68	89.5	0	100	100	100	
C279b	0	0	0	0	0	0	0	
	96	48.89	0	100	0	100	100	100
		53.19	93.62	100	0	100	100	100
		47.73	95.45	100	0	100	100	100
	168	82.35	90.59	100	0	100	100	100
		73.17	82.93	100	0	100	100	100
82.76		86.21	100	0	100	100	100	
C853	0	0	0	0	0	0	0	
	96	0	80	98	0	100	100	100
		0	93.62	0	0	100	100	100
		0	88.46	0	0	100	100	100
	168	0	0	93.3	0	100	100	100
		0	0	100	0	100	100	100
0		0	96.1	0	100	100	100	
C40	0	0	0	0	0	0	0	
	96	100	90.91	0	100	100	100	100
		100	0	0	100	100	100	100
		100	87.72	0	100	100	100	100
	168	100	88.24	0	100	100	100	100
		100	81.93	94	100	100	100	100
100		91.86	0	100	100	100	100	
C342	0	0	0	0	0	0	0	
	96	0	56	100	0	100	100	100
		0	61.7	100	0	100	100	100
		0	64.71	100	0	100	100	100
	168	0	87.5	100	0	100	100	100
		0	89.02	100	0	100	100	100
0		88.1	100	95.2	100	100	100	
C507	0	0	0	0	0	0	0	
	96	0	95	97.5	0	100	100	100
		0	97.67	0	0	100	100	100
		0	97.78	0	0	100	100	100
	168	0	98.82	0	92.9	100	100	100
		0	0	95.2	88	100	100	100
0		0	0	97.7	100	100	100	

T1: *Melissa officinalis*, T2: *Origanum vulgare*, T3: *Jatropha gossypilia*, T4: *Eucalyptus* sp. T5: *Melia azederach*, T6: *Mascagnia concinna*, T7: nistatina.



**Foto 2.** Efecto de inhibición de plantas nativas sobre el crecimiento de cepas de *Colletotrichum* en relación con el testigo absoluto. **A:** *Melia azederach*, **B:** *Mascagnia concinna*, **C:** *Jatropha gossypilia*, **D:** Testigo.

susceptible a la acción de los mismos. Los demás aislados registraron valores de inhibición próximos a 60%.

Aunque no existen evidencias científicas para comparar los resultados obtenidos en este estudio, se ha demostrado en *M. azederach* la presencia de compuesto fenólicos con efecto insecticida contra plagas agrícolas. Estos compuestos tienen un amplio rango de efecto biológico que incluyen antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio y vasodilatador. Además de las anteriores propiedades, ensayos con extractos de hojas maduras de esta planta mostraron mortalidad sobre adultos de *Drosophyla melanogaster* (Urquiaga y Leighton, 2000; Kahkonen *et al.*, 2001). Con respecto a trabajos de actividad inhibitoria sobre hongos del género *Colletotrichum* causante de la enfermedad de la antracnosis en el cultivo del ñame no hay reportes al respecto; sin

embargo estudios realizado por Hernández y Vásquez (2007) muestran que la aplicación de extractos vegetales de hojas de *Piper aduncum* y *Thymus vulgaris* y de flores de *Matricharia chamomilla* permiten controlar en condiciones in vitro y en plántulas el desarrollo del hongo *C. gloeosporoides*, causante de la antracnosis en el tomate de árbol.

*Mascagnia concinna*, conocida vulgarmente como cansaviejo o mindaca es una especie vegetal considerada como maleza de clima cálido y se ha reportado para los departamentos de Bolívar, Magdalena, Cesar y Sucre. Aunque ha sido demostrada su toxicidad para vacunos por su alto contenido de ácido cianhídrico (Jiménez, 2005), no existen evidencias de actividad inhibitoria sobre patógenos causantes de enfermedades en humanos y plantas.

## Conclusiones

Este estudio permitió evaluar el efecto inhibitorio de extractos obtenidos de seis especies vegetales sobre seis aislados de hongos del género *Colletotrichum* causante de la enfermedad de la antracnosis del cultivo del ñame en el departamento de Sucre. Los mejores resultados de actividad inhibitoria fueron observados por los extractos de hojas secas de *M. azederach* y *M. concinna* sobre todos los aislados evaluados, convirtiéndose este estudio in vitro en el primer reporte a nivel nacional como una alternativa promisoriosa para el manejo de la antracnosis causada por especies de *Colletotrichum* en cultivo de ñame en el departamento de Sucre. Estudios posteriores permitirán identificar los principales metabolitos involucrados en el efecto inhibitorio, así como su concentración mínima y su posterior evaluación in vivo sobre variedades de ñame susceptibles a la antracnosis.

## Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al doctor Javier Beltrán Herrera, Director del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre, a la bióloga Eydye-lyana Month Juris, investigadora del Proyecto de Manejo de la Antracnosis del Cultivo del Ñame en el departamento de Sucre.

## Referencias

- Bernal, A.; Zamora, J.; Virgen, G.; y Nuño, R. 2005. Actividad biológica in vitro de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. Rev. Mex. Fitopatol. 23(2):140 - 146.
- Chamorro, L. y Pérez, K. 2011. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de los extractos de hojas secas de *Melia azederach* y *Mascagnia* sp. sobre aislados de hongos del género *Colletotrichum* causante de la antracnosis en el cultivo del ñame. Trabajo de grado. Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia.
- Díaz, H. y Ramírez, L. 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). SciTechn. 13(33):397 - 400.
- Guo, Z.; Xing, R.; Liu, S.; Zhong, Z.; Ji, X.; Wang, L.; y Li, P. 2008. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. Carbohydrate Polymers 71(4):694 - 697.
- Gualtier, M.; González, M.; Contreras, K.; Noguera, M.; Uzcátegui, E.; Villasmil, S.; y Villalta, C. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica*. Rev. INHRR. 39(2):12 - 16.
- Hernández, E. y Vásquez, J. A. 2007. Evaluación de tres extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.) en tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae* (Cav.) Sendt). Trabajo de grado. Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá, Colombia. 86 p.
- Jiménez, S. 2005. Toxicidad de algunas plantas medicinales. Disponible en: [www.grupo-gema.blogspot.com/2008/07/plantas-toxicas.html](http://www.grupo-gema.blogspot.com/2008/07/plantas-toxicas.html)
- Kahkonen, M.; Hopia, A.; y Heinonen, M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 49:4076 - 4082.
- Mendoza, C.; Moreno, C.; Weil, M.; y Elango, F. 2007. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de *Phytophthora palmivora* butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. Tierra Trop. 3(1):81 - 89.
- Pérez, L.; Baquero, M.; y Beltrán, J. 2003. Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* spp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. Rev. Col. Biotecnol. 5(1):24 - 35.
- R Development Core Team 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Urquiaga, I. y Leighton, F. 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biol. Res. 33:55 - 64.