

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE *Colletotrichum gloeosporioides* Penz

Anabel Avalos Gavilla*, Lilián M. Morales Romero y Xiomara Rojas Moya.

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo, CP: 53 000, Villa Clara, Cuba.

*Autora para la correspondencia: extnaturales@inivit.cu

Recibido: 6 de diciembre de 2019; Aceptado: 17 de diciembre de 2019

RESUMEN

Se determinó en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), el efecto inhibitorio de los extractos vegetales de *Psidium guajava* L. (guayaba), *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (caña santa), sobre el crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, obtenido de frutos enfermos de papaya (*Carica papaya* L.). Se evaluaron extractos acuosos de las tres especies, a tres concentraciones 15 %, 25 %, 35 % disueltas en agar papa dextrosa (PDA), más un testigo absoluto con cinco repeticiones distribuidas en un diseño completamente al azar. Los extractos se obtuvieron por maceración con agua estéril. Los tratamientos se incubaron a 29 °C, midiéndose el diámetro de crecimiento cada 24 horas durante cinco días. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo. El extracto de canela a una concentración del 35 % mostró una inhibición del crecimiento en un 62,7 %. Sin embargo, los extractos de guayaba y caña santa mostraron inhibición del crecimiento en un 50,91 % y un 46,94 % respectivamente. Los extractos ensayados mostraron efectividad en contra del patógeno en los análisis *in vitro*.

Palabras clave: antracnosis, *C. gloeosporioides*, extractos vegetales, inhibición del crecimiento, papaya

ANTIFUNGAL POTENTIAL OF VEGETABLE EXTRACTS ON *IN VITRO* GROWTH OF *Colletotrichum gloeosporioides* Penz

ABSTRACT

It was determined at the Phytopathology Laboratory of the Research Institute of Tropical Roots and Tuber Crops (INIVIT), the inhibitory effect of plant extracts from *Psidium guajava* L. (guava), *Cinnamomum zeylanicum* Blume (cinnamon), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (lemongrass) on the *in vitro* growth of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, obtained from diseased fruits of papaya (*Carica papaya* L.). Aqueous extracts of the three species were evaluated at three concentrations 15 %, 25 %, 35 %, dissolved in potato dextrose agar (PDA), plus an absolute control with five repetitions, distributed in a completely randomized design. The extracts were obtained by maceration with sterile water. The treatments were incubated at 29 °C and the growth diameter was measured every 24 hours during five days. The inhibition percentage of fungus growth was calculated. The cinnamon extract showed an inhibition growth of 62,7% at a concentration of 35 %. However, guava and lemongrass extracts showed an inhibition growth of 50,91 % and 46,94 % respectively. The tested extracts showed effectiveness against the pathogen in the *in vitro* analyses.

Keywords: anthracnose, *C. gloeosporioides*, plant extracts, inhibition growth, papaya.

INTRODUCCIÓN

La producción agrícola mundial se ve afectada por la proliferación de diferentes patógenos, entre los cuales los hongos representan una extensa parte. El uso de los plaguicidas de origen sintético para su control, ha originado problemas por su uso indiscriminado (López-Benítez *et al.*, 2005). La resistencia de las plagas a los principios activos utilizados, la presencia de residuos en las cadenas alimenticias, el ambiente físico, la destrucción de la fauna benéfica y el resurgimiento de las plagas después del tratamiento por los plaguicidas, son solo algunos problemas que se han derivado de esta situación. Por tanto, el control de los agentes patógenos se hace cada vez más difícil (Lucas, Hawkins y Fraaije, 2015).

La antracnosis es una infección causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, la misma constituye la enfermedad más importante en papaya (*Carica papaya* L.) y en muchas otras frutas en la etapa de postcosecha. La aplicación de fungicidas sintéticos constituye el principal método de control de la enfermedad (Xu *et al.*, 2017).

Dada la necesidad de reducir el uso de químicos sintéticos en la agricultura, se ha incrementado el interés por la posible aplicación de extractos vegetales para el control de los mismos. Los extractos vegetales de cada planta pueden tener hasta más de sesenta componentes y de ellos pueden haber varios con propiedades antifúngicas; generalmente están presentes como mezclas de compuestos y los patógenos pueden ser afectados diferencialmente por los compuestos individuales o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones (Montes-Belmont y Carvajal, 2009). El objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial antifúngico de tres especies vegetales para el control *in vitro* de *C. gloeosporioides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el mes de junio del año 2019 en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), provincia Villa Clara, Cuba.

Obtención de los extractos vegetales

Las especies vegetales empleadas para la obtención de los extractos, fueron recolectadas de diferentes destinos. Las hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) y de caña santa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) fueron colectadas en el Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, entre las 8:00 y las 9:00 horas. Previo a su recolección se realizó la identificación de las especies por un especialista, además fueron comparadas ejemplares de las plantas colectadas con muestras ya identificadas en el herbario de dicho jardín.

Se recolectaron hojas maduras. Las mismas fueron trasladadas en bolsas de polietileno transparentes hasta el Laboratorio de Fitopatología del INIVIT; se lavaron con agua potable durante 15 min, se secaron en estufa a 65 °C durante 72 horas y se pulverizaron en un molino de cuchillas, con tamiz de 3 mm a 6000 rpm, durante 10 min. Por otro lado, la canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) empleada en el estudio fue el producto comercializado en forma de canela en rama.

- Extractos acuosos de guayaba (*P. guajava*) y caña santa (*C. citratus*).

De la muestra vegetal de guayaba fraccionada, se pesaron 10 g y se maceraron con 100 mL de agua estéril. Se agitó la mezcla manualmente durante 15 minutos para lograr

una mejor unión entre las partículas y luego se filtró a gravedad por una capa de papel de filtro previamente esterilizado. A partir de este extracto obtenido se prepararon las diferentes concentraciones para el envenenamiento del medio. Se procedió de igual forma para obtener el extracto de caña santa.

- Extracto acuoso de canela (*C. zeylanicum*)

Se pesaron 10 g de canela en rama. Se colocaron 100 mL de agua estéril a calentar hasta ebullición, cuando estuvo el agua hirviendo se le añadieron los 10 g de canela en rama, se tapó el recipiente y se dejó reposar la mezcla durante 10 min. Luego se filtró la solución por una capa de papel de filtro previamente esterilizado. A partir de este extracto obtenido se prepararon las diferentes concentraciones para el envenenamiento del medio.

Actividad antifúngica *in vitro*

Se seleccionaron frutos de papaya en etapa de madurez, con uniformidad de apariencia, tamaño y con síntomas de antracnosis. Se tomaron fragmentos del tejido enfermo y se sembraron en placas Petri, con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), de la compañía BioCen y se incubaron a una temperatura de 29 °C para su crecimiento durante 10 días. Una vez identificado el hongo como *C. gloeosporioides*, se tomó una porción del tejido del hongo para transferirlo a una nueva placa Petri con medio fresco. A partir de su crecimiento se inició el proceso de purificación del aislamiento con el propósito de obtener cepas puras esporuladas para su utilización en el estudio *in vitro*.

Se pesaron 39 g de PDA, se rehidrataron en 1 L de agua destilada y se dejaron reposar durante 15 min. Se calentó la mezcla, agitándola manualmente hasta el punto de ebullición y se dejó hervir durante 1 min para disolver el medio por completo. Se esterilizó la mezcla en autoclave a 121 °C, durante 15 min. Se dejó enfriar la mezcla hasta 60 °C. Bajo el flujo laminar se tomaron alícuotas de 15, 25 y 35 mL del extracto de guayaba (*P. guajava*) y se añadieron a tres recipientes respectivamente. Se completó hasta 100 mL con el medio de cultivo y se agitaron los recipientes durante unos segundos para que se mezclaran por completo los componentes. Se extendieron las soluciones en placas de Petri de 75 mm de diámetro. Se realizaron cinco repeticiones para cada tratamiento incluyendo un testigo absoluto que contenía medio de cultivo solamente. En cada placa se vertió 15 mL del medio envenenado. Este proceso se repitió para los extractos de caña santa (*C. citratus*) y canela (*C. zeylanicum*).

Una vez solidificado el medio de cultivo se colocaron, en el centro de la placa, discos de cinco mm de diámetro del tejido micelial del hongo *C. gloeosporioides*. Se incubaron a una temperatura de 26 °C durante cinco días midiéndose el diámetro del crecimiento del micelio cada 24 horas. Se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial a las 24, 48, 72 y 96 horas empleando la fórmula siguiente:

$$\% = \frac{DCC - DCT}{DCC} \times 100$$

Donde:

DCC- Diámetro de la colonia control

DCT- Diámetro de la colonia tratada

100- factor matemático

Análisis estadístico

Para comparar los tratamientos en cuanto a diámetro de crecimiento de la colonia de *C. gloeosporioides* y porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se realizaron análisis de varianza para cada momento de evaluación y las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan, para un nivel de confianza del 95 %. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el paquete estadístico InfoStat, versión 2017 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antifúngica *in vitro*

Los extractos de las tres especies vegetales evaluadas tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. En todos los tratamientos y en todos los momentos evaluados se observó una disminución en el diámetro de crecimiento del hongo, presentando diferencias estadísticas significativas con respecto al control negativo (Tabla 1). Este efecto fue influenciado por el período de incubación y la concentración de los extractos.

Tabla 1. Efecto de los extractos acuosos *P. guajava*, *C. citratus* y *C. zeylanicum* sobre el crecimiento de la colonia de *C. gloeosporioides*.

Extracto	Tiempo (h)	Dosis			
		Control	15 %	25 %	35 %
Extracto de guayaba (<i>P. guajava</i>)	24	9,8 ± 0,37 d	6,6 ± 0,24 c	5,8 ± 0,37 b	5,4 ± 0,24 a
	48	32 ± 0,55 d	27 ± 0,71 c	23 ± 0,71 b	18 ± 0,32 a
	72	41,2 ± 0,58 d	37,2 ± 0,37 c	30,4 ± 0,93 b	26,8 ± 0,37 a
	96	58 ± 0,45 d	52,8 ± 0,58 c	49,2 ± 0,37 b	47,2 ± 0,37 a
Extracto de caña santa (<i>C. citratus</i>)	24	10,4 ± 0,55 d	8,2 ± 1,30 c	7,2 ± 0,33 b	6,4 ± 0,32 a
	48	32,2 ± 0,37 d	27,2 ± 0,84 c	23,4 ± 1,52 b	19 ± 0,23 a
	72	45,6 ± 0,58 d	36,8 ± 1,30 c	30 ± 0,87 b	28,1 ± 0,37 a
	96	58,6 ± 0,55 d	52,8 ± 0,84 c	49 ± 0,4 b	45,1 ± 0,58 a
Extracto de canela (<i>C. zeylanicum</i>)	24	8 ± 0,32 d	7,6 ± 0,25 c	7,4 ± 0,25 b	6,2 ± 0,2 a
	48	33,4 ± 0,68 d	28,5 ± 0,60 c	25,2 ± 0,38 b	16,8 ± 0,58 a
	72	42,8 ± 1,16 d	37,8 ± 0,38 c	28,2 ± 0,58 b	23,8 ± 0,58 a
	96	51,2 ± 0,58 d	44,8 ± 0,38 c	40,4 ± 0,51 b	27,6 ± 0,68 a

*Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El extracto acuoso de canela presentó mayor poder inhibitorio contra *C. gloeosporioides*, inhibiendo el crecimiento micelial del hongo en un 62,7 % a la concentración de 35 % disuelto en PDA. Sánchez-Barrueto y Luján-Corro en 2013 determinaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial y del extracto acuoso de *C. zeylanicum* sobre *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*. Los resultados mostraron que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso y el aceite esencial de canela sobre el crecimiento de *C. albicans*, fue de 1 mg.ml⁻¹. Así mismo, se halló que la CMI del extracto acuoso y del aceite esencial de la canela sobre el crecimiento del *S. mutans* fue 0,8 mg.ml⁻¹ y 1 mg.ml⁻¹, respectivamente.

En una investigación realizada por Ramírez González *et al.*, en 2017, evaluaron *in vitro* el efecto regulador de hidrodestilados y aceites de *Cinnamomum zeylanicum* Nees, *Syzygium aromaticum* L. y *Pimenta dioica* obtenidos por destilación tradicional y

asistido por microondas, sobre *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum* aislados de *Lycopersicon esculentum* y sobre *C. gloeosporioides* aislado de *Carica papaya* L. Los resultados indicaron que tanto el método tradicional de hidrodestilación y el asistido por microondas utilizando clavo, canela y pimienta permiten extraer metabolitos capaces de inhibir en diferentes porcentajes tanto el crecimiento como la formación de conidios, sin embargo, se aprecia que el asistido por microondas permite obtener una mayor concentración de ellos, lo que logró reducir la CMI en la que afectan a los patógenos en comparación al método de destilación tradicional.

Igualmente Ochoa Fuentes *et al.*, en 2012 determinaron la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de pirul, chirimoya, canela y tabaquillo sobre el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium solani*. Los resultados mostraron que los extractos de chirimoya y canela presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial y esporulación.

Los extractos de guayaba y caña santa también inhibieron el crecimiento micelial del hongo, pero en menor medida 50,91 % y 46,94 % respectivamente a esta misma concentración. Estos resultados (Figura 1) coinciden con los obtenidos por Baños Guevara *et al.*, 2004, en el que evaluaron 18 extractos de plantas. Solo los de ajo (*Allium sativum* L.), hierba santa (*Piper auritum* L.), guayaba (*P. guajava*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) redujeron significativamente el crecimiento de *C. gloeosporioides* en 54,34 %, 48,82 %, 47,77 % y 39,03 %, respectivamente; sin embargo, *P. guajava* presentó un alto grado de contaminación.

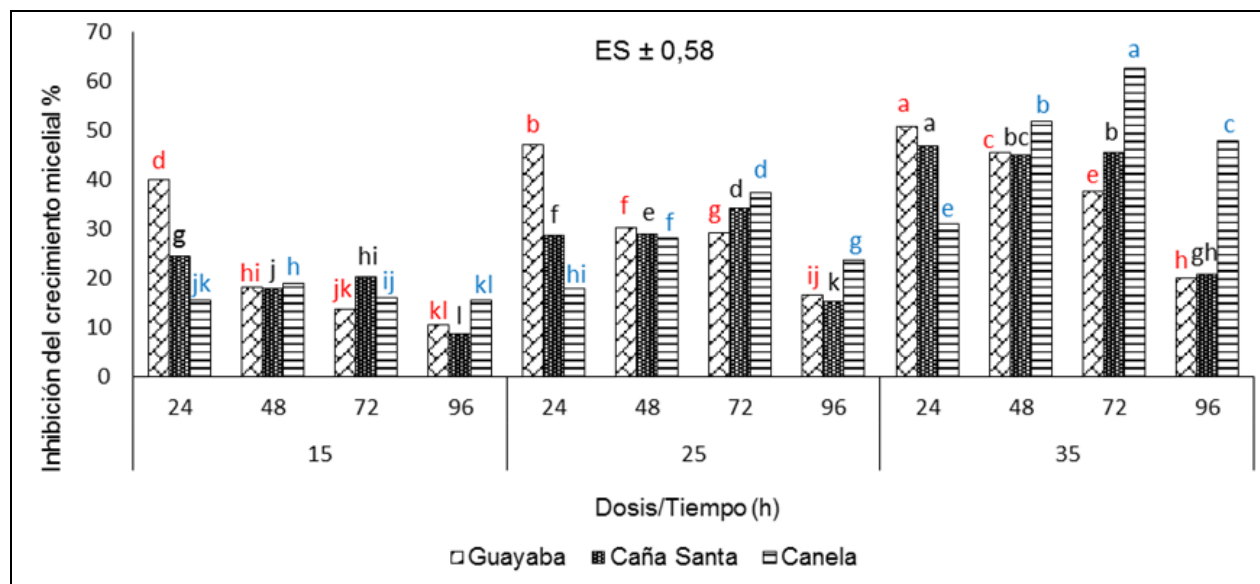


Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial el hongo *C. gloeosporioides* a 29 °C en cinco días de incubación.

El aceite esencial de *C. citratus* se ha utilizado ampliamente como medicamento tradicional y es bien conocido por sus propiedades antimicrobianas. Sahal *et al.*, en 2019 investigaron los efectos antifúngicos de este aceite, para esto compararon la eficacia de los aceites esenciales *Cymbopogon citratus* (Nees ex Steud.) J.F. Watson, *Cuminum cyminum* L., *Citrus limon* (L.) Osbeck y *Cinnamomum verum* J. Presl en la formación de biopelículas de tres aislamientos de *Candida tropicalis* en placas de

poliestireno de 24 pocillos. El aceite de *C. citratus* mostró la concentración mínima inhibitoria más baja de todos los aceites esenciales probados e inhibió la formación de biopelículas de todas las cepas de *C. tropicalis* demostrando así su alta capacidad antifúngica.

CONCLUSIONES

A dosis adecuadas, el uso de extractos canela, guayaba y caña santa mostraron inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *C. gloeosporioides*. Estos extractos constituyen una alternativa viable para el control de la antracnosis en frutos de papaya en poscosecha.

BIBLIOGRAFÍA

- BAÑOS GUEVARA, P.E.; E. ZAVALETA MEJÍA; M.T. COLINAS LEÓN; I. LUNA ROMERO y J.G. GUTIÉRREZ ALONSO. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en papaya Maradol Roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2): 198-205.
- LÓPEZ-BENÍTEZ, A.; S.R. LÓPEZ-BETANCOURT; M.E. VÁZQUEZ-BADILLO; S.A. RODRÍGUEZ-HERRERA; M. MENDOZA-ELOS y E. PADRÓN-CORRAL. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. mediante extractos vegetales acuosos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2): 183-190.
- LUCAS, J.A.; N.J. HAWKINS y B.A. FRAAIJE. 2015. The Evolution of Fungicide Resistance. En: S. SARIASLANI y G.M.B.T.-A. in A.M. GADD (eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, p. 29-92.
- MONTES-BELMONT, R. y M. CARVAJAL. 2009. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection*, 61(5): 616-619.
- OCHOA FUENTES, Y.M.; E. CERNA CHÁVEZ; J.L. LANDEROS FLORES; S. HERNÁNDEZ CAMACHO y J.C. DELGADO ORTIZ. 2012. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 81(1): 69-73.
- RAMÍREZ GONZÁLEZ, S.I.; O. LÓPEZ BÁEZ; S. ESPINOSA ZARAGOZA y A. WONG VILLARREAL. 2017. Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(8): 1879.
- SAHAL, G.; H.J. WOERDENBAG; W.L.J. HINRICHS; A. VISSER; P.G. TEPPER; W.J. QUAX; H.C. VAN DER MEI y I.S. BILKAY. 2020. Antifungal and biofilm inhibitory effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on biofilm forming by *Candida tropicalis* isolates; an *in vitro* study. *Journal of Ethnopharmacology*, 246: 112188.
- SÁNCHEZ-BARRUETO, C. y M. LUJÁN-CORRO. 2013. Efecto antimicrobiano del aceite esencial y del extracto acuoso de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*. *SCIENDO*, 16(1): 68-78.
- XU, X.; H. LEI; X. MA; T. LAI; H. SONG; X. SHI y J. LI. 2017. Antifungal activity of 1-

methylcyclopropene (1-MCP) against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in postharvest mango fruit and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, 241:1-6.